METODY BADAŃ MIKROŚWIATA

Marcin Kucia (Kraków)

Część I – Początki

Już w starożytności ludzie zauważyli, że kawałek przeźroczystego kryształu może być użyty do podpalenia tkaniny lub pergaminu. Nie zdawali sobie jednak sprawy do czego jeszcze można go wykorzystać. Taki kawałek szkła przypominał kształtem ziarna soczewicy, dlatego nadano mu nazwę soczewki. Dopiero wielcy holenderscy konstruktorzy XVI wieku, Zachariasz i Hans Janssen, dali ludzkości narzędzie pozwalające wniknąć w głąb tego, co wydawało się niepodzielne i całkowicie spójne. Skonstruowali pierwszy na świecie mikroskop świetlny, który do oświetlenia preparatu wykorzystywał światło dzienne. Niestety nie potrafili uzyskać urządzenia, które powiększałoby badany obiekt więcej niż 10-cio krotnie. Dlatego wynalazek ten nie uzyskał aprobaty środowiska naukowego, ze względu na jego małą przydatność. Na szczęście innemu holendrowi, Antoniemu van Leeuwenhoek, udało mu się udoskonalić wynalazek Janssen'a. W XVII wieku, stworzył on pierwszy funkcjonalny pod kątem obserwacji mikroświata mikroskop optyczny, którego zdolność powiększająca wynosiła aż 270x. To bardzo dużo jak na ówczesną technologię. Antonie van Leeuwenhoek zastosował nową metodę szlifowania i polerowania soczewek. Wykorzystywał małe soczewki o bardzo krótkiej ogniskowej, które następnie odpowiednio przygotowywał. Mikroskop Leeuwenhoeka (Ryc. 1) nie przypominał budową jego współczesnego odpowiednika, ale działał na podobnej zasadzie. Zbudowany był z małej soczewki osadzonej w mosiężnej płytce, natomiast obiekt do obserwacji kładziono w punkcie naprzeciwko soczewki, na specjalnej, regulowanej śrubami iglicy. Leeuwenhoek przy pomocy swojego mikroskopu jako pierwszy zdołał zaobserwować takie struktury żywe jak bakterie, mikroby w kropli wody, czerwone ciałka krwi oraz plemniki. Jego badania stworzyły nowe gałezie biologii oraz pozwoliły ludzkości zaglądnąć w głąb tego, co niewidzialne gołym okiem. Inny angielski konstruktor XVII wieku, Robert Hooke, potwierdził odkrycia swojego holenderskiego kolegi oraz udoskonalił wygląd mikroskopu. Jako źródła świata użył lampy olejowej, soczewki skupiającej i zwierciadła wklęsłego, dzięki temu kierował światło prosto na badany obiekt. Jako pierwszy z badaczy obserwował i narysował strukturę korka oraz do opisu swoich obserwacji użył terminu "komórka – *cell*". Mikroskop Hooke'a (Ryc. 2) wyglądem zaczął przypominać współcześnie używane urządzenia.



Ryc. 1. Mikroskop Leeuwenhoeka oraz obraz komórek krwii widziany przy jego pomocy. (http://www.brianjford.com/wavrbct.htm; http://sykofanta.wordpress.com/2010/02/25/antony-van-leeuwenhoek).

Dalsze badania nad udoskonaleniami mikroskopii optycznej prowadzono w XVIII i XIX wieku. Udało się wprowadzić kilka innowacji technicznych, które ułatwiły posługiwanie się mikroskopem jako narzędziem badawczym oraz rozpowszechniły go na całym świecie. W 1830 roku naukowiec Joseph Jackson Lister zauważył, że gdy połączy się ze sobą kilka słabszych soczewek zachowując przy tym odpowiedni odstep między nimi, uzyska się obraz pozbawiony zamgleń. Był to pierwszy krok do niwelacji aberracji sferycznych soczewek, które wynikały z faktu iż każdy promień światła przechodzi przez soczewkę i załamuje się pod trochę innym kątem, więc nie skupia się w jednym punkcie, tzw. ognisku. Jednakże nie jest możliwe stworzenie idealnej soczewki, która mogłaby skupiać wszystkie promienie dokładnie w danym punkcie. By taki system mógł istnieć soczewka musi spełniać warunki soczewki nieskończenie cienkiej.

Wszechświat, t. 114, nr 10-12/2013

Ponieważ każdy promień światła przechodzący przez soczewkę o danej grubości zostaje załamany przy wejściu do ośrodka, z którego zrobiona jest soczewka oraz przy wyjściu z niego, zastosowanie szeregu przy-



Ryc. 2. Mikroskop Hooke'a (A) oraz obraz komórek korka uzyskany przy jego pomocy (B). (http://www.ssplprints.com/image/100215/richardson -claire-hooke-microscope-c-1675; http://askabiologist.asu.edu/explore/building-blocks-life)

legających do siebie małych soczewek zniwelowało ten problem. Innym ważnym odkryciem w roku 1878 wykazał się Ernst Abbe, który sformułował pierwszą matematyczną teorię łączącą rozdzielczość mikroskopu z długością fali świetlnej. Przy pomocy jego wzoru uzyskano możliwość obliczenia maksymalnej rozdzielczości mikroskopu, czyli najmniejszej odległości między dwoma punktami, które możemy pod tym mikroskopem od siebie odróżnić:

 $d = \lambda/2NA$

gdzie:

d – rozdzielczość mikroskopu

 λ – długość fali świetlnej

NA – apertura numeryczna obiektywu

Aperturę numeryczną (Ryc. 3) nazywamy miarą zdolności rozdzielczej obiektywu mikroskopu, za-



Ryc. 3. Rysunek przedstawiający schemat układu optycznego i rolę kąta aperturowego α .

leżną od połowy maksymalnego kąta rozwarcia (α) promieni świetlnych trafiających do obiektywu oraz od współczynnika załamania światła (n) na drodze między obiektywem, a obserwowanym preparatem. Wyraża się ją wzorem NA = n sin α . Kolejnym krokiem w dziedzinie ulepszenia mikroskopii optycznej było skonstruowanie w 1903 roku przez Richarda Zsigmondy'a i Henry'ego Siedentopfa ultramikroskopu. Używano go do oglądania obiektów mniejszych od długości fali świetlnej, tj. cząsteczek roztworu koloidalnego. Zasada działania tego urządzenia była prosta. Promienie świetlne padające z boku na obserwowany roztwór ulegały silnemu załamaniu. Następnie trafiały pod kątem prostym do obiektywu tworząc mozaikę jasnych plam. Dzięki tej technice można było wnioskować o obecności w badanym roztworze poszukiwanych obiektów. Wadą urządzenia był brak możliwości uzyskania informacji na temat kształtu i dokładnej wielkości badanych cząstek. Innym ważnym odkryciem Zsigmondy



Ryc. 4. Obraz komórki nabłonkowej z jamy ustnej uzyskany przy użyciu mikroskopii ciemnego pola. (fot. Marcin Kucia).

był mikroskop ciemnego pola (Ryc. 4), który również wykorzystywał zjawisko ugięcia fal świetlnych na preparacie. Do obiektywu trafiały tylko promienie załamane (rozproszone), dzięki temu obserwowany obiekt był przedstawiony w formie jasnego obrazu na czarnym tle. Umożliwiło to obserwowanie żywych organizmów bez konieczności ich barwienia i utrwalania. Promienie nierozproszone, niosące informacje o obrazie tła były pochłaniane przez przesłonę polową.

Przy pomocy zwykłego mikroskopu ze światłem przechodzącym, tzw. mikroskopu jasnego pola mamy możliwość badania obiektów wcześniej zabarwionych lub takich, które posiadają zabarwienie naturalne. Dzieje się tak ponieważ do oczu obserwatora dociera obraz obiektu, który ma zdolność do absorbowania fal świetlnych, a tło jest jasne ponieważ promienie świetlne nie są pochłaniane przez żaden obiekt i swobodnie przenikają dalej. W 1932 roku Frits Zernike stworzył układ optyczny pozwalający na obserwacje obiektów prawie przeźroczystych. Nazwał go kontrastem fazowym (Ryc. 5). Taki mikroskop kontrastowo

-fazowy charakteryzuje się posiadaniem dwóch charakterystycznych elementów: płytki fazowej i przesłony pierścieniowej. Zasada działania jest następu-



Ryc. 5. Obraz tej samej komórki nabłonkowej przy użyciu dwóch typów układów optycznych: jasne pole (A), kontrast fazowy (B). (fot. Marcin Kucia).

jąca. Mikroskop rejestruje zmiany fazy fali świetlnej przechodzącej przez badany obiekt w stosunku do fali świetlnej przechodzącej przez tło preparatu, a następnie (dzięki zjawisku interferencji) przekształca je na widoczne zmiany natężenia światła. Innymi słowy, gdy badamy obiekt, który nie wykazuje absorpcji światła (czyli jest przeźroczysty), ale zmienia jego fazę, to jedną z technik, jaką powinniśmy zastosować, by móc go zaobserwować, jest skorzystanie z mikroskopii kontrastowo – fazowej.

Innym typem mikroskopu wykorzystującego zmiany w strukturze przechodzącego światła jest mikroskop polaryzacyjny. Skonstruowany w 1834 roku przez W. H. F. Talbot'a, stał się narzędziem niezbędnym przy badaniach geologicznych minerałów oraz do obserwacji niektórych struktur biologicznych, które posiadają zdolność do skręcania płaszczyzny polaryzacyjnej światła. Mikroskop ten posiada między okularem i źródłem światła dwa polaryzatory ustawione do siebie pod katem prostym. Zadaniem pierwszego z nich jest spolaryzowanie światła w ściśle określonym kierunku. Takie światło przechodzi przez obserwowany preparat i pada na drugi polaryzator zwany analizatorem. Jeżeli preparat nie skręcił płaszczyzny polaryzacji światła to wówczas wiązka nie zostanie przez analizator przepuszczona i obrazu preparatu nie zobaczymy. Płaszczyzna polaryzacji światła padającego na analizator jest bowiem prostopadła do płaszczyzny polaryzacji światła przepuszczanego przez analizator. Jeżeli natomiast analizowany obiekt skręca płaszczyznę polaryzacji, to do analizatora dojdzie wiązka światła o płaszczyźnie polaryzacji posiadającej niezerową składową w kierunku, w którym analizator przepuszcza światło. Do oka obserwatora dochodzi więc obraz struktury badanej substancji wynikający z jej zdolności do zmiany kierunku polaryzacji światła (Ryc. 6).

Kolejnym ważnym wynalazkiem XX wieku był mikroskop polaryzacyjno-interferencyjny, działający na podobnej zasadzie co mikroskop kontrastowo-fazowy. Obraz powstawał w skutek pomiaru przesunięcia fazowego światła przechodzącego przez dany



Ryc. 6. Mikroskop polaryzacyjny (A) oraz obraz fragmentu skalenia sodowo-potasowego o rozmiarach 0,4 mm uzyskany w mikroskopie polaryzacyjnym (B). (*http://pl.wikipedia.org/wiki/Mikroskop_polaryzacyjny*).

obiekt w stosunku do środowiska o innym współczynniku załamania światła. W 1955 roku Jerzy Nomarski opracował lepszy układ optyczny nazwany mikroskopem interferencyjnym o kontraście różnicowym (Ryc. 7). Obecnie ma on szerokie zastosowanie w biologii dzięki swoim możliwościom pomiaro-



Ryc. 7. Obraz tej samej komórki z hodowli in vitro przy użyciu trzech typów układów optycznych: jasne pole (A), kontrast fazowy (B), kontrast różnicowo-interferencyjny (C). (http://zseis.zgora.pl/biologia/mikroskopy.htm).

wym. Zasada jego działania opiera się na pomiarze struktur różniących się współczynnikiem załamania światła, dzięki nieznacznym przesunięciom w fazie interferujących (nakładających się) promieni świetlnych. W odróżnieniu od mikroskopu kontrastowo-

Wszechświat, t. 114, nr 10-12/2013

ARTYKUŁY

fazowego, układ Nomarskiego pozwala na pomiary miedzy innymi: przesunięcia fazowego, grubości obiektu, współczynnika załamania światła, suchej masy komórek oraz innych parametrów fizycznych. Ponadto obiekty oglądane sprawiają wrażenie trójwymiarowych, co jest niebywałą zaletą, ze względu na możliwość badania ich struktury i morfologii.

Część II – Błyskawiczny postęp

Wszystkie opisane w części pierwszej metody obrazowania mikroświata nie były jednak wystarczajaco dobre do prowadzenia zaawansowanych badań naukowych. Przed badaczami istniało wiele pytań i nierozwiązanych problemów, dopiero wprowadzenie całkiem innego typu mikroskopu jakim był mikroskop fluorescencyjny zmieniło znacząco oblicze nowoczesnej nauki. Był to jeden z milowych kroków i dawał niewiarygodne możliwości badawcze. Ten typ mikroskopii powstał z początkiem XX wieku. Na jego późniejszy sukces miało wpływ parę czynników m.in. powstanie nowych fluorescencyjnych barwników, które specyficznie łączyły się z wybranymi strukturami komórkowymi. Inną ważną kwestią było wynalezienie przeciwciał sprzężonych z barwnikami, nazwano je sondami fluorescencyjnymi. Dzięki nim można badać pojedyncze białka, receptory, kompleksy enzymatyczne czy też białka cytoszkieletu komórkowego. Kolejnym przełomem było w latach 60. XX wieku wyizolowanie białka zielonej fluorescencji (ang. green fluorescence protin – GFP) z meduzy Aequorea victoria. Znajomość I-rzędowej struktury tego białka umożliwiła naukowcom wykorzystanie jej jako nietoksycznej metody badania ekspresji genów oraz przy śledzeniu wielu innych procesów komórkowych bezpośrednio pod mikroskopem. Ogólna zasada działania mikroskopu fluorescencyjnego opiera się na prostej zasadzie zachowania energii. Jeśli atom bądź cząsteczka barwnika zostanie potraktowana światłem o danej długości fali, to ulegnie ona wzbudzeniu. Elektrony zostaną przesunięte na wyższe powłoki atomowe, czego skutkiem będzie zmiana stanu energetycznego atomu. Taki pobudzony atom bądź cząsteczka zachowuje się niestabilnie, daży do powrotu do poprzedniego, podstawowego stanu energii. Istnieja 3 możliwości przejścia atomu ze stanu pobudzonego do stanu stacjonarnego. Po pierwsze, może dojść do wygenerowania energii w postaci promieniowania cieplnego. Po drugie, może wystąpić fosforescencja, czyli zjawisko świecenia substancji po wcześniejszym jej naświetleniu danym czynnikiem lub napromieniowaniem pokrewnego rodzaju. Fosforescencja działa na podobnej zasadzie jak fluorescencja, ale różni się czasem trwania. W nauce za zjawisko fosforescencji uważa się każde zjawisko luminescencyjne trwające dłużej niż 10⁻⁸ sekundy. Po trzecie może zajść zjawisko fluorescencji. Fluorescencja charakteryzuje się tym, że jeśli wzbudzamy cząsteczkę światłem o długości fali krótszej (np. odpowiadającej światłu niebieskiemu), to światło emisyjne będzie miało dłuższą długość (np. odpowiadającą barwie zielonej). Wynika to z faktu, iż energia z jaką dana cząstka jest pobudzana, jest zawsze większa od energii światła emisyjnego. Najlepiej prezentuje tą sytuacje diagram Jabłońskiego (Ryc. 8).



Ryc. 8. Diagram Jabłońskiego. (http://pl.wikipedia.org/wiki/Diagram_Jabłońskiego).

Obecnie istnieje wiele metod i układów optycznych wykorzystujących zjawisko fluorescencji. Głównym i najprostszym urządzeniem jest mikroskop epifluorescencyjny, nieznacznie różniący się od typowych mikroskopów świetlnych. Charakteryzuje się głównie posiadaniem źródła światła o różnej długości fal. Jest to najczęściej lampa rtęciowa, która generuje światło w zakresie UV. Następnie przy pomocy specjalnego filtra z takiego źródła światła "wycinane" są odpowiednio; światło niebieskie, czerwone i inne. Tak oto otrzymana wiązka światła kierowana jest przez układ soczewek oraz luster wprost na preparat. Gdy zachodzi zjawisko fluorescencji, promienie światła emisyjnego trafiają poprzez lustro dichroiczne (czyli lustro przepuszczające wiązkę o ściśle określonej długości fali) do oczu eksperymentatora. Lustro dichroiczne spełnia tu funkcje podwójną. Po pierwsze przepuszcza światło wzbudzające preparat oraz filtruje je, by nie dotarło do okularu. Po drugie pozwala na dotarcie światła emisyjnego do oczu obserwatora. Dzięki zastosowaniu lustra dichroicznego uzyskujemy obraz badanego obiektu świecacego w danym kolorze emisji na czarnym tle. Preparat, który obserwujemy posiada jednak pewne zniekształcenia wynikające z efektu epifluorescencyjnego. Jest to związane

z tzw. efektem halo, który prezentuje się nachodzeniem na siebie odblasków wynikających z emisji światła z całej powierzchni preparatu. By zdjęcia uzyskane pod mikroskopem fluorescencyjnym posiadały dobry kontrast i wysoką rozdzielczość, konieczne stało się wprowadzenie pewnych udoskonaleń i stworzenie całkiem innego typu mikroskopu. Nazwano go mikroskopem konfokalnym (Ryc. 9). Urządzenie to znacznie różni się od typowego mikroskopu. Źródłem



Ryc. 9. Mikroskop konfokalny Zeiss Axiovert 200M LSM 510 META z zakładu Biologii i Obrazowania Komórki Instytutu Zoologii UJ (A) oraz trójwymiarowy obraz zarodka świni domowej w stadium 8-komórkowym – barwione żółte (MitoTracker Orange) mitochondria i niebieskie (DAPI) jądra komórkowe (B). (fot. Marcin Kucia).

światła nie jest lampa rtęciowa wielkości małego pudełka, a zestaw laserów wyglądem przypominający dużą lodówkę przemysłową. Zasada działania mikroskopu konfokalnego jest następująca: światło lasera pada na próbkę tylko w danym punkcie i płaszczyźnie preparatu. Sygnał emisji światła rejestrowany jest przy pomocy kamery CCD lub fotopowielacza, a następnie przetwarzany na sygnał elektryczny, który odpowiada jasności piksela na ekranie monitora. Tak przeskanowana cała powierzchnia preparatu w danej płaszczyźnie obrazowania pozwala uwidocznić całą strukturę badanej próbki. Kluczowym elementem jest przesłona Pinhole, której zadaniem jest wycięcie nadmiernego promieniowania emisyjnego ze stożka światła powstającego podczas punktowego skanowania preparatu laserem, nim dotrze on do powierzchni detektora (Ryc. 10). Dzięki takiemu zastosowaniu układu optycznego uzyskujemy obraz o bardzo dobrym kontraście i dużej rozdzielczości, rzędu 180 - 200 nm. Ponadto mikroskopia fluorescencyjna, a szczególnie konfokalna, dawała możliwości rekonstrukcji trójwymiarowej badanych próbek oraz wprowadziła parę ważnych metod wykorzystujących zjawisko fluorescencji tj. FRET (ang. Fluorescence Resonance Energy Transfer) i FRAP (ang. Fluorescence recovery after photobleaching). Techniki te pozwalają na badanie takich procesów komórkowych jak transport wewnątrzkomórkowy, czy ko-lokalizacja białek, np. białek cytoplazmatycznych.

Mikroskopia konfokalna obecnie przeżywa swój rozkwit, powstają coraz to nowsze układy optyczne, którecharakteryzująsięwysokązdolnościąrozdzielczą imponując tym samym środowisku naukowemu. Jednym z takich urządzeń jest mikroskop dwufotonowy



Ryc. 10. Schemat układu optycznego wykorzystywanego w mikroskopii konfokalnej.

(Ryc. 11), zwany też mikroskopem naturalnie konfokalnym. Dlaczego? Jest to zwyczajny mikroskop konfokalny, który nie posiada przesłony Pinhole, a jedynie pewną modyfikację w procesie obrazowania.



Ryc. 11. Zielona fluorescencja białka GFP widoczna w korze wzrokowej myszy transgenicznej dzięki zastosowaniu mikroskopu dwufotonowego. (https://www.dana.org/news/brainwork/detail.aspx?id=822).

Źródłem światła nie są lasery emitujące fotony w zakresie światła widzialnego, a jedynie laser zdolny do emitowania światła w zakresie podczerwieni (700– 1000 nm). Udowodniono, że cząsteczka fluorochromu wzbudzona przy pomocy fotonów o niższej energii wykazuje fluorescencję tylko w bardzo wąskiej

płaszczyźnie obrazowania. Nad nią i pod nią do wzbudzenia nie dochodzi. Dlatego przesłona konfokalna jest niepotrzebna. Jednakże by mogło dojść do emisji światła zabsorbowanego przez barwnik konieczne jest dostarczenie mu takiej samej energii jak w przypadku laserów emitujących światło w zakresie widzialnym. W tym momencie po raz kolejny naukowcy skorzystali z zasady zachowania energii. Gdy podziałamy na cząsteczkę barwnika dwoma fotonami o mniejszej o połowę wartości energii niż energia konieczna do zajścia emisji w czasie krótszym niż kilkadziesiąt femtosekund (10⁻¹⁵s), to dojdzie do wzbudzenia fluorescencji. Taki rozwiązanie ma swoje wady i zalety. Główna wadą jest konieczność utrzymania stałej płaszczyzny obrazowania oraz użycia silnych laserów impulsowych o dużej mocy i zdolności do uzyskania gęstego strumienia fotonów. Zalety jakie wynikają z tego rozwiązania to przede wszystkim możliwość uzyskiwania skrawków optycznych (nie występuje tradycyjne krojenie preparatu w sposób fizyczny, ale optyczny jak w każdym mikroskopie konfokalnym) o wysokiej ostrości i kontraście. Jest to spowodowane tym, iż materia organiczna praktycznie nie pochłania i nie rozprasza światła podczerwonego.

Na prosty i zarazem genialny pomysł wpadł w 1991 roku Stefan Hell, konstruując mikroskop 4Pi (Ryc. 12). Jest to typowy mikroskop konfokalny posiadający dodatkowy obiektyw po spodniej stronie preparatu. Pomysł zastosowania podwójnego układu obiektywów po obydwu stronach próbki powstał przy



Ryc. 12. Obraz komórki z wykorzystaniem układu 4Pi (A) oraz zwykłej mikroskopii konfokalnej (B). Schemat układu dla mikroskopii 4Pi (C). (http://englishclass.jp/reading/topic/SP-8_(Brazil)).

założeniach równania Abbe'go. Tak jak wspomniano wyżej zdolność rozdzielcza zależy od apertury numerycznej obiektywu, która jest funkcją kąta aperturowego α. Mówiąc prościej, im większy jest kąt aperturowy, tym więcej informacji o strukturze preparatu możemy uzyskać. W ten sposób udało się zwiększyć rozdzielczość mikroskopu konfokalnego o połowę (z 200 nm do 100 nm). Ważnym elementem w całym procesie obserwacji przy zastosowaniu takiego układu optycznego jest prawidłowe przygotowanie preparatu. W tym przypadku, gdy mamy do czynienia z dwoma obiektywami, musimy zwrócić uwagę na sposób w jaki światło lasera będzie przechodzić przez próbkę. W normalnym mikroskopie z jednym obiektywem, próbkę umieszcza się pomiędzy relatywnie grubym szkiełkiem podstawowym, a cienkim szkiełkiem nakrywkowym. W przypadku mikroskopii 4Pi konieczne jest zastosowanie dwóch szkiełek nakrywkowych, co ma za zadanie zoptymalizować prace obydwu obiektywów. Ważne jest zachowanie takich samych warunków załamania światłą dla każdego z obiektywów oraz zastosowanie szkła o najwyższej jakości optycznej.

Obecnie systemem fluorescencyjnym o najwyższej możliwej zdolności rozdzielczej jest mikroskop STORM (ang. stochastic optical reconstruction microscopy). Przy jego pomocy możemy uzyskiwać obrazy o rozdzielczości rzędu 10 nm. To tak, jakby ludzki włos zmniejszyć pięć tysięcy razy. Konstrukcja mikroskopu STORM nie różni się zbytnio od wysokiej jakości układów konfokalnych. Ważnym elementem, dzięki któremu możemy zaobserwować efekt superrozdzielczości (Ryc. 13), jest sposób rejestracji fotonów światła fluorescencyjnego oraz nastę-



Ryc. 13. Zdjęcia A, C, E przedstawiają obraz włókien cytoszkieletu w normalnym mikroskopie konfokalnym. Zdjęcia B, D, F przedstawiają obraz tych samych włókien cytoszkieletu tylko przy zastosowaniu techniki superrozdzielczości STORM. (http://www.microscopyu.com/articles/ stormintro.html).

pująca po nim analiza matematyczna źródeł emisji. Mówiąc prościej, gdy mamy do czynienia z materiałem badawczym, który charakteryzuje się dużą gęstością wyznakowanych fluorescencyjnie struktur np. włókna cytoszkieletu czy siateczki śródplazmatycznej, przy pomocy mikroskopii STORM jesteśmy w stanie uwidocznić ich poszczególne składowe.

Zasada działania układu opiera się na zastosowaniu lasera o słabej mocy, tak by mógł on wzbudzić tylko losowo wybrane cząsteczki barwnika. W ten sposób po kilkukrotnym przeskanowaniu preparatu uzyskany rozkład miejsc aktywacji barwnika poddawany jest analizie matematycznej w celu znalezienia maksimów emisji światła fluorescencyjnego. Po wszystkich czynnościach obraz składany jest w całość, dając wspaniały efekt superrozdzielczości.

Naukowcy w dążeniu do zbadania coraz to mniejszych struktur zarówno materii żywej jak i nieożywionej zaprzęgli do pracy elektrony. Tak powstały dwa typy mikroskopów sięgających dalej w głąb niż jakiekolwiek inne urządzenia przed nimi. W 1931 roku niemiecki konstruktor Ernst Ruska wraz z Maksem Knollem stworzyli pierwszy na świecie Transmisyjny mikroskop elektronowy (ang. Transmission electron microscopy – TEM) i skaningowy mikroskop elektronowy (ang. scanning electron microscopy – SEM) (Ryc. 14). Zasada ich działania jest bardzo badaniu miały grubość nie większą niż 0,1 µm. Przy zastosowaniu układu SEM niezbędne jest pokrycie badanej próbki metalem przewodzącym prąd, najczęściej jest to złoto. Proces ten nazywa się napylaniem. Przez konieczność długotrwałego i kosztownego przygotowania preparatów mikroskopia elektronowa jest technika trudna i wymaga dużej wiedzy ze strony eksperymentatora. Należy też pamiętać, że podczas procesu utrwalania i kontrastowania preparatu moga wystąpić pewne artefakty zaburzające realny obraz badanej struktury. Mimo pewnych wad mikroskopia elektronowa stała się głównym narzędziem badawczym biologów, geologów i metalurgów. Pozwoliła wniknąć do świata, o którym nie mieliśmy pojęcia (ryc. 15). Dostarczyła nieocenionej wiedzy, która posłuży całym pokoleniom naukowców. Pozwoliła na zbadanie struktur komórkowych takich organizmów jak bakterie, pierwotniaki czy grzyby oraz ciekawych tworów z pogranicza świata ożywionego jak wirusy, priony czy wiroidy.



Ryc. 14. Mikroskop elektronowy transmisyjny (A) i skaningowy (B) – zakład Biologii i Obrazowania Komórki Instytut Zoologii UJ. (fot. Marcin Kucia).

podobna do tradycyjnych mikroskopów optycznych, jednakże w mikroskopii elektronowej zamiast wiązki fotonów przechodzących przez układy soczewek używa się wiązki ściśle skoncentrowanych elektronów, skupianych za pomocą soczewek elektromagnetycznych oraz detektorów. Konieczne jest też umieszczenie całego układu w próżni, by zapobiec oddziaływaniu elektronów z innymi cząstkami materii normalnie obecnymi w powietrzu. Dzięki temu uzyskujemy układ pozwalający na zbadanie preparatu z największą możliwą dotąd zdolnością rozdzielcząrzędu 1 nm (kilku atomów). Wadą urządzenia jest fakt, że preparat musi być utrwalony, a w przypadku mikroskopii TEM ważne jest, by skrawki poddawane Mimo tak wielu informacji, które udało się uzyskać, pozostaje dalej wiele pytań dotyczących samej natury mikroświata. Naukowcy dostali możliwość zbadania struktur rzędu 1 nm, ciekawość nie pozwoliła im zatrzymać się w miejscu. Chęć coraz to większego wgłębiania się w naturę oraz jej niesamowitą istotę pozwoliła na opracowanie kilku technik badawczych pozwalających na obrazowanie wręcz niemożliwych do ujrzenia struktur. Jedną z takich metod jest odkryta już na początku XX wieku krystalografia rentgenowska (Ryc. 16), która umożliwiła badanie struktury przestrzennej pojedynczych białek, kwasów nukleinowych oraz innych oligocząstek występujących w każdym żywym organizmie. Zasada

Wszechświat, t. 114, nr 10-12/2013

ARTYKUŁY

jej działania opiera się na rejestracji obrazów dyfrakcyjnych promieni rentgenowskich, powstających na skutek interakcji tego promieniowania z chmurami



Ryc. 15. Obraz mikrokosmków pęcherza pławnego ryby z rodziny amiowatych (*Amia clava*) uzyskany przy pomocy mikroskopii Elektronowej Transmisyjnej (A, B) (fot. Leszek Satora). Powiększony obraz struktury płytek skrzydła motyla (C, E) (fot. Tomasz Pyrcz) uzyskany za pomocą Skaningowego mikroskopu elektronowego. Ponadto obraz komórek krwi – erytrocytów (D) i muszli ślimaka (F) (fot. Andrzej Falniowski) uzyskany techniką Skaningowej mikroskopii elektronowej.



Ryc. 16. Obraz dyfrakcyjny kryształu proteinazy K, wzór punktów i względną intensywność każdej plamki mogą być wykorzystane do określenia bezwzględnej struktury enzymu. (http://www.synchrotron.org.pl/publ/biulet/vo09/p004-Dauter.pdf).

elektronowymi atomów tworzących analizowany kryształ. Najtrudniejszym etapem przygotowawczym

jest uzyskanie odpowiedniej wielkości kryształu (od 0,1 do 1 mm), co w przypadku niektórych białek czy innych cząstek organicznych jest procesem bardzo trudnym i czasochłonnym. Czas powstania kryształów niektórych białek może wynosić aż do kilku tvgodni, ponadto niektóre z nich ulegaja rozpadowi w temperaturze pokojowej czy podczas samego procesu analizy promieniami X. Następnie na podstawie powstałych obrazów dyfrakcyjnych dokonywane jest wyznaczenie trójwymiarowej mapy gęstości elektronowej (Ryc. 17). Dalsza analiza matematyczna pozwala na wyznaczenie wielu parametrów tj. pozycji i odległości czastek względem siebie, położenia atomów względem siebie, ustalenia katów między nimi, czy też ustalenia konfiguracji absolutnej cząsteczek. Dzięki krystalografii rentgenowskiej możliwe stało się wyznaczenie dokładnej struktury takich cząsteczek jak mioglobina (Max Perutz i John Cowdery Kendrew 1958 rok - Nagroda Nobla w 1962 roku) czy podwójna helisa DNA (Rosalind Franklin, James Watson, Francis Crick - Nagroda Nobla w 1962 roku).



Ryc. 17. Mapa gęstości elektronowej nitrobenzenu. (http://archiwum.wiz. pl/1999/99022700.asp).

Obecnie jesteśmy w stanie obserwować strukturę powierzchni próbek ze zdolnością rozdzielczą rzędu pojedynczego atomu dzięki wykorzystaniu zjawiska oddziaływań między atomowych. Urządzeniem, w którym zastosowano tę zasadę jest mikroskop sił atomowych (ang. atomic force microscope – AFM). Po raz pierwszy skonstruowany przez Gerda Binniga, Calvina F. Quate i Christophera Gerbera w 1986 roku. Wzorowany i inspirowany wcześniejszym wynalazkiem jakim był skaningowy mikroskop tunelowy (ang. scanning tunnelling microscope – STM). AFM działa na dość skomplikowanej zasadzie pomiaru siły oddziaływania miedzyatomowego pomiędzy atomem z powierzchni próbki, a pojedynczym atomem ostrza umieszczonym na specjalnej mikrodźwigni (Ryc. 18).

Następnie dane o sile tych oddziaływań są przenoszone poprzez detektor (skaner piezoelektryczny) do komputera, gdzie przy pomocy odpowiedniego oprogramowania przekonwertowywane są na widzialny obraz struktury badanej powierzchni. Mikroskop STM działa na podobnej zasadzie, jednakże przedmiotem badania nie są siły między atomowe, a zmiany napięcia



Ryc. 18. Skan topografii powierzchni szkła (E) oraz włókien kolagenowych (A, B, C) w mikroskopie sił atomowych AFM (D). (http://www.lab.umcs.lublin.pl/afm.php; http://en.wikipedia.org/wiki/ Atomic_force_microscope http://www.nist.gov/mml/bbd/cell_systems/ collagen-films-protocol.cfm).

między zbliżającymi się do siebie atomami ostrza i atomami próbki. Kolejnym ważnym krokiem było zauważenie, że gdy przyłożymy większe napięcie do ostrza mikroskopu, uzyskamy efekt oderwania atomu z powierzchni próbki. Uzyskano narzędzie pozwalające na kształtowanie mikroświata w skali atomowej. Stworzono więc pierwszą nanodrukarkę.

Wszystkie wyżej wymienione instrumenty badawcze pozwoliły ludzkości na zbadanie cząstki samych siebie. Od prostych urządzeń z lusterkiem i lampą olejową po skomplikowane maszyny wymagające dużej ilości energii i wyspecjalizowanego oprogramowania każdy z nich przedstawia pewną historię, ludzki wysiłek i niewiarygodną ciekawość. Jako ludzie jesteśmy jedynym znanym nam gatunkiem zamieszkującym tą małą planetę, zadającym coraz to trudniejsze pytania i szukającym coraz to trudniejszych do uzyskania odpowiedzi; tylko przyszłość pokaże do czego będziemy zdolni w poszukiwaniu prawdy i poznania. Podobnie jak dzieci, poszukujemy odpowiedzi, które wraz rozwojem cywilizacji i nowoczesnych technik badawczych pozwolą na coraz doskonalsze poznanie nas samych.

Mgr Marcin Kucia Instytut Zoologii UJ Zakład Biologii i Obrazowania Komórki. E-mail: marcin.kucia@uj.edu.pl.

CZY W BIOLOGII MODELE MATEMATYCZNE ODEGRAJĄ PODOBNĄ ROLĘ, JAK W ROZWOJU ASTRONOMII?

Ryszard Tadeusiewicz (Kraków)

Dziedziną nauki, którą ja się osobiście zajmuję, jest Biocybernetyka. Gdyby chcieć najkrócej powiedzieć, czym ona jest, to można by wskazać na łączne występowanie w jej nazwie pierwiastka związanego z biologią, medycyną, przyrodą ("Bio...") oraz pierwiastka związanego z techniką i naukami ścisłymi ("cybernetyka"). Oznacza to, że biocybernetyka "spina" dziedzinę biologii i medycyny z dziedziną techniki. Czy takie "spięcie" jest potrzebne?

Zdecydowanie tak!

Biologia i medycyna w coraz szerszym zakresie korzystają z pomocy różnych urządzeń technicznych przy poznawaniu kolejnych tajemnic Natury i przy skuteczniejszym leczeniu chorób. Aparatura do sekwencjonowania genów, mikroskop elektronowy, tomograf komputerowy czy robot chirurgiczny – to tylko wybrane przykłady niezliczonych dziś systemów technicznych, które wytworzone są przez



Ryc. 1. Wzajemne korzyści z przenikania idei biologicznych do techniki (na dole) i systemów technicznych do biologii i medycyny (na górze).

372