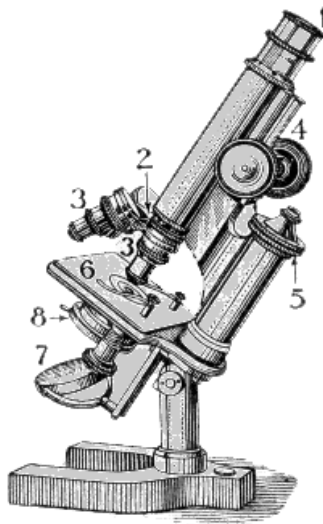


**MATERIAŁY POMOCNICZE
DO WYKŁADÓW Z PODSTAW BIOFIZYKI
IIIr. Biotechnologii
prof. dr hab. inż. Jan Mazerski**



TECHNIKI MIKROSKOPOWE

Przez wiele tysięcy lat człowiek gromadził wiedzę o obiektach ożywionych na podstawie tego, co mógł zobaczyć gołym okiem. Dopiero na przełomie XVI i XVII w. pojawiły się pierwsze mikroskopy. Otworzyły one przed badaczami świat komórek i „mikrobów”. Kolejnym przełomem było wynalezienie w latach ‘30 XX w. mikroskopu elektronowego.

Przełomem zupełnie innego rodzaju było odkrycie przez Roentgena tzw. promieni X. Odkrycie to zapoczątkowało rozwój tzw. metod obrazowania pozwalających na nieinwazyjne badanie wnętrza organizmów żywych. Rozwój tych technik, wspierany coraz szybszymi i potężniejszymi komputerami, otwiera przed naukami biologicznymi i medycznymi zupełnie nowe perspektywy badawcze.

Mikroskopia optyczna

Za twórców mikroskopu uważa się Holendrów, braci Hansa i Zachariasza Janssenów. Pierwsze konstrukcje wykonali oni około roku 1590. Ze względu na słabe powiększenie (ok. 10 razy) mikroskopy nie zdobyły wtedy uznania jako narzędzie badawcze. Przełomu dokonał wynalazca i przedsiębiorca Antonie van Leeuwenhoek, który w XVII wieku udoskonalił konstrukcję mikroskopu, a następnie rozwinął produkcję tych urządzeń. Leeuwenhoek jako pierwszy obserwował żywe komórki – plemniki, pierwotniaki, erytrocyty itp.

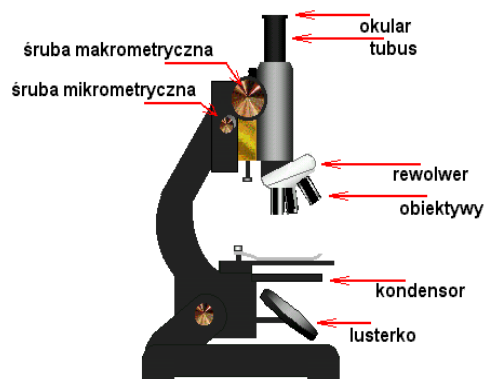
Konstrukcja mikroskopu

Konstrukcja mikroskopu nie zmieniła się w zasadzie od ok. 150 lat. Zdjęcie obok przedstawia mikroskop firmy Zeiss z roku 1879. Zawiera on już wszystkie typowe elementy współczesnego mikroskopu:

- układ oświetlający (lusterko i soczewkę skupiającą, tzw. kondensor)
- stolik do zamocowania szkiełka z preparatem
- zestaw wymiennych obiektywów z uchwytem rewolwerowym
- śrubę mikrometryczną do regulacji odległości okularu od obiektywu
- regulację ostrości widzenia



Przedstawiony poniżej rysunek współczesnego mikroskopu zawiera dokładnie te same elementy.



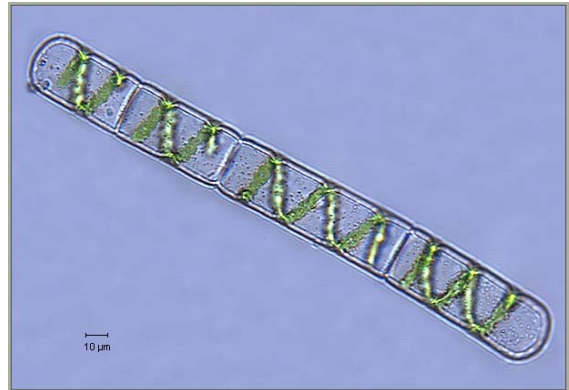
Ograniczenia mikroskopii optycznej

Początkowo podstawowym ograniczeniem jakości uzyskiwanych obrazów mikroskopowych były wady soczewek (aberracja chromatyczna, aberracja sferyczna). Problem ten pokonano, przynajmniej w najdroższych modelach, w 2. połowie XIX w. Napotkano wtedy na kolejną barierę. Zjawiska dyfrakcji/interferencji powodują, że ostro zobaczyć można tylko obiekty o rozmiarach wielokrotnie większych niż długość stosowanej fali. Obiekty mniejsze niż $\frac{1}{2}$ długości fali nie są w ogóle widoczne. Obiekty o wielkości rzędu długości fali pojawiają się w obrazie mikroskopowym, ale w formie zniekształconej: otoczone barwnymi obwódkami, zwielokrotnionymi krawędziami itp. (patrz zdjęcie obok). Dlatego też nawet najlepsze mikroskopy optyczne pracujące w zakresie światła widzialnego osiągają maksymalne powiększenia rzędu 1 500x. Mikroskopy pracujące w zakresie ultrafioletu osiągają maksymalne powiększenie do ok. 3 500x.



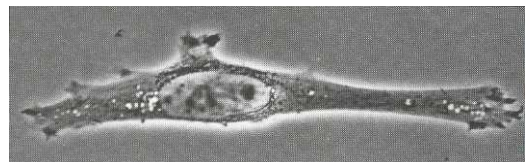
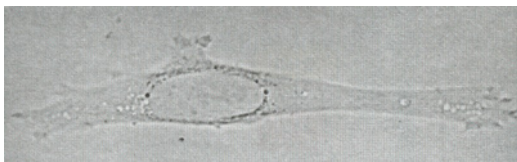
Mikroskopia transmisyjna

W badaniach biologicznych i medycznych korzysta się najczęściej z mikroskopii transmisyjnej – obserwujemy światło przechodzące przez badany obiekt. Ponieważ większość składników komórkowych jest przezroczysta i pozbawiona barwy, więc istotnym ograniczeniem możliwego do zastosowania powiększenia jest problem zaobserwowania niewielkich różnic w natężeniu przechodzącego światła. Poniższe dwie mikrofotografie alg *Spirogyra* wykonano przy różnych powiększeniach, jednak ilość informacji o budowie komórek możliwa do uzyskania z obu fotografii jest w zasadzie taka sama. Wyraźnie widać jedynie ścianę komórkową i spiralnie ułożone chloroplasty. Pozostałe elementy wnętrza komórki tak mało różnią się stopniem absorpcji światła, że nie dadzą się zaobserwować niezależnie od zastosowanego powiększenia.



Mikroskopia z kontrastem fazowym

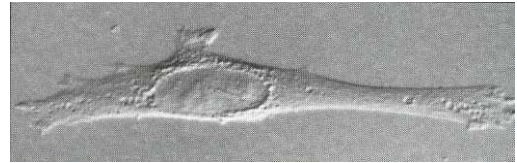
Jeszcze silniej problem ten występuje w przypadku skrawków tkanek lub komórek zwierzęcych (rys. poniżej po lewej). Poszukiwano więc metod pozwalających zwiększyć kontrast pomiędzy różnymi elementami składowymi komórki. Jednym z takich sposobów okazało się zastosowanie tzw. kontrastu fazowego (rys. po prawej).



W technice tej obraz powstaje przez nałożenie na siebie dwóch wiązek światła: jednej pochodzącej bezpośrednio z oświetlacza i drugiej, która przeszła przez badany obiekt. Jeżeli w badanym obiekcie znajdują się przestrzenie o różnych współczynnikach załamania, to w wiązce światła po przejściu przez obiekt będziemy mieli promienie różniące się przesunięciem fazowym. Interferencja takiej wiązki z wiązką odniesienia uwidoczni w obrazie mikroskopowym obszary różniące się nie stopniem absorpcji, lecz współczynnikiem załamania.

Mikroskopia polaryzacyjna

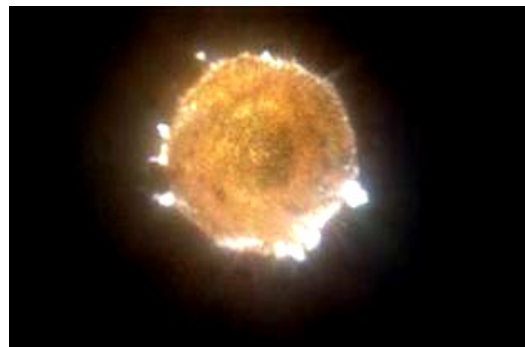
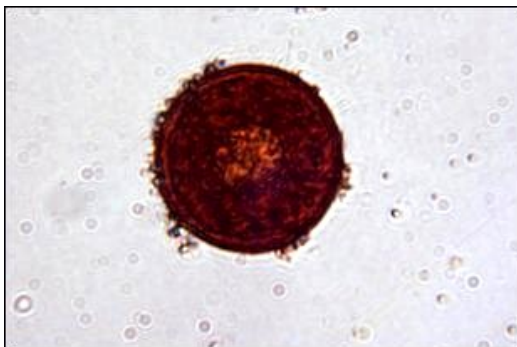
Inną techniką pozwalającą uwidocznić w obrazie mikroskopowym więcej szczegółów jest tzw. kontrast interferencyjno-różniczkowy (rys. po prawej).



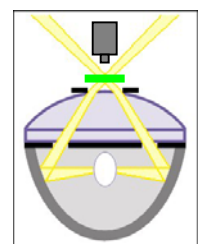
W technice tej obraz powstaje również przez nałożenie na siebie dwóch wiązek światła, ale tym razem światła spolaryzowanego. Jeżeli w badanym obiekcie znajdują się obszary zdolne do skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego liniowo, to interferencja wiązki penetrującej z wiązką odniesienia uwidoczni te obszary w obrazie mikroskopowym. Zdolność do skręcania płaszczyzny światła posiadają związki chiralne, a więc w obiektach biologicznych białka, polisacharydy i kwasy nukleinowe. Zastosowanie kontrastu interferencyjno-różniczkowego uwidacznia w obrazie mikroskopowym obszary różniące się stężeniami tych biopolimerów.

Mikroskopia z ciemnym tłem

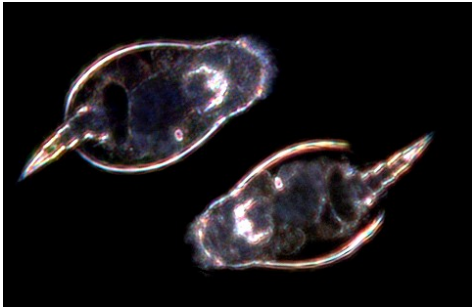
Przy niezbyt dużych powiększeniach można często zaobserwować trochę więcej szczegółów obserwowanego obiektu stosując tzw. „ciemne tło”. W technice tej obserwuje się nie światło przechodzące przez badany obiekt, lecz światło rozpraszane przez obiekt. Stopień i sposób rozpraszania światła jest dużo bardziej zróżnicowany niż osłabianie światła przechodzącego.



Technika z ciemnym tłem wymaga specjalnego sposobu oświetlenia preparatu (rysunek). Wiązka światła ogniskowana jest na badanym preparacie, jednak pada na niego nie w osi optycznej mikroskopu lecz w formie pobocznic stożka. Obiektyw mikroskopu znajduje się wewnątrz stożka tworzonego przez światło przechodzące przez preparat. Tym samym do obiektywu mikroskopu trafia jedynie światło rozproszone na preparacie.



Mikroskopia z ciemnym tłem jest szczególnie przydatna do obserwacji delikatnych struktur znajdujących się na zewnątrz organizmu lub komórki, np. odnóży, rzęski, filamenty itp.

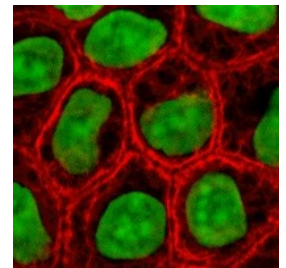


Wybarwienie preparatów

Konstrukcja mikroskopów optycznych nie zmieniła się praktycznie od ponad 100 lat. Pomimo to, po chwilowym zastoju w latach '60 XXw. mikroskopia optyczna święci obecnie coraz większe tryumfy i dostarcza coraz bardziej wartościowych danych. Jest to wynikiem rozwoju metod wybarwiania preparatów.

Barwniki tradycyjne

Już w XIXw. zauważono, że niektóre barwniki mają zdolność wybiórczego oddziaływania z wybranymi składnikami komórek: białkami, lipidami, kwasami nukleinowymi itp. Z biegiem czasu opracowano standardowe procedury wybarwiania preparatów pozwalające na uwidocznienie szeregu kluczowych dla komórki elementów. Rysunek obok pokazuje mikrofotografię komórek nabłonka wybarwionych mieszaniną dwóch barwników: barwnikiem czerwonym wiążącym się wybiórczo z białkiem keratyną i barwnikiem zielonym wiążącym się z DNA. Dzięki takiej kombinacji barwników widać jednocześnie błony komórkowe i jądra komórek.



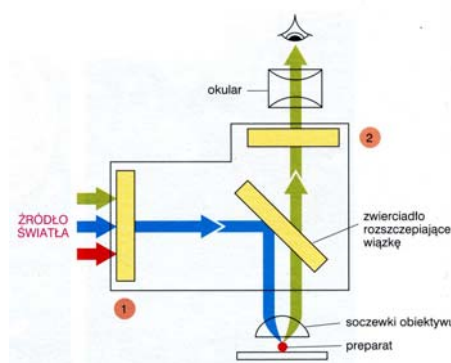
Aby uzyskać wybarwienie struktur wewnątrzkomórkowych czynnik barwiący musi spełniać szereg warunków:

- ✓ Musi wnikać do wnętrza komórki (ew. po jej permeabilizacji)
- ✓ Musi wybiórczo wiązać się z określonymi elementami komórki
- ✓ Musi na tyle silnie oddziaływać z wybarwianym elementem, aby jego lokalne stężenie zapewniało dostatecznie silną absorpcję światła nawet przy bardzo dużym stopniu powiększenia
- ✓ Nie może wiązać się z białkami zawartymi w cytoplazmie

Stosowane są również barwniki wrażliwe na warunki panujące w środowisku i zmieniające swoją barwę przy zmianie warunków (np. pH).

Mikroskopia fluorescencyjna

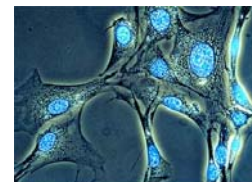
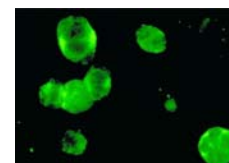
Również niektóre barwniki fluorescencyjne posiadają zdolność do wybiórczego wiązania się z elementami komórki. Wykorzystano to w tzw. mikroskopii fluorescencyjnej. W metodzie tej oświetla się preparat od strony obiektywu światłem o długości fali wywołującej fluorescencję barwnika, a obserwuje preparat przy długości fali odpowiadającej silnej fluorescencji. Stosując odpowiedni zestaw filtrów można uzyskać efekt ciemnego pola. We współczesnych mikroskopach fluorescencyjnych najczęściej światło wzbudzające kierowane jest na preparat poprzez obiektyw (rysunek obok). Światło emitowane z preparatu zbierane jest przez obiektyw i po przejściu przez zestaw filtrów kierowane jest do okularu. W starszych konstrukcjach stosowano układ optyczny podobny do układu wywołującego efekt ciemnego pola w mikroskopach świetlnych. Obecnie stosowany system wzbudzenia (obiektyw skupia światło wzbudzające na preparacie) pozwala uzyskać duże lokalne natężenia światła wzbudzającego przy niewielkiej mocy źródła.



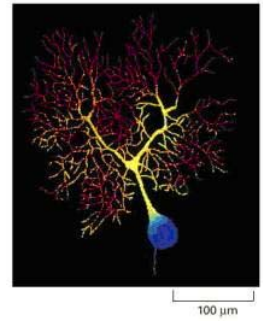
Barwniki fluorescencyjne (fluorochromy)

Zastosowanie barwników fluorescencyjnych ma szereg zalet:

- obserwuje się emisję światła na ciemnym tle, co zwiększa czułość metody i poprawia kontrast obserwowanych szczegółów. Ten wzrost czułości jest na tyle istotny, że we wszystkich technikach wybiórczego wybarwienia konkretnych makrocząsteczek stosuje się prawie wyłącznie barwniki fluorescencyjne, a nie klasyczne barwniki absorpcyjne.
- siła i barwa fluorescencji mogą zależeć od warunków panujących w środowisku: pH, potencjał redox, lipofilowość, potencjał błonowy. Pozwala to różnicować komórki lub ich fragmenty ze względu na panujące w nich warunki. Rysunek obok pokazuje jądra komórkowe wybarwione barwnikiem DAPI. Związek ten fluoryzuje na niebiesko po interkalacji do DNA.

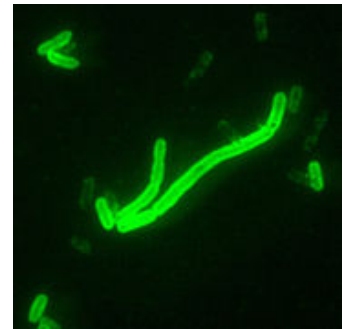


- siła i barwa fluorescencji mogą zależeć od stężenia niektórych jonów, np. Ca^{2+} . Pozwala to wykryć różnice w stężeniu tego jonu. Rysunek obok pokazuje rozkład stężenia jonów Ca^{2+} w komórce nerwowej. Wysokie stężenie - kolor czerwony, niskie stężenie – kolor niebieski.

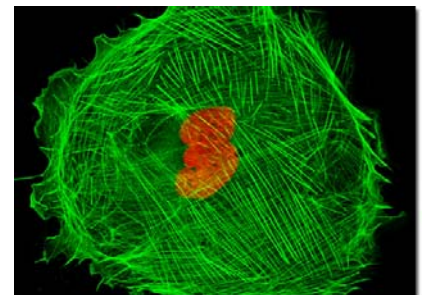


Przeciwciała fluoryzujące

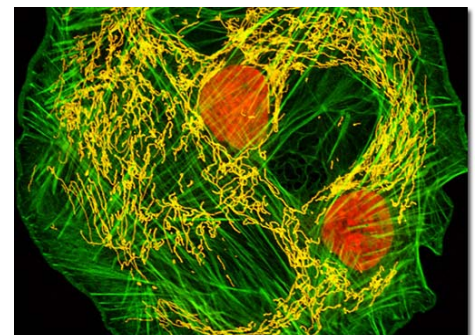
Szczególnie interesujące dane o lokalizacji poszczególnych struktur komórkowych i/lub ich składników uzyskuje się stosując barwniki fluorescencyjne połączone kowalencyjnie z przeciwciałami monoklonalnymi. Zdjęcie obok pokazuje komórki pałeczek dżumy uwidocznione dzięki przeciwciałom specyficznym w stosunku do antygenów powierzchniowych tej bakterii i związanym z barwnikiem fluoryzującym na zielono i.



Wysoka specyficzność przeciwciał pozwala identyfikować (wybarwiać) w komórce lub tkance pojedyncze białka. Zdjęcie pokazuje rozmieszczenie włókien aktynowych stanowiących składnik cytoszkieletu komórki. Zielony barwnik fluorescencyjny został w tym przypadku związany z przeciwciałami monoklonalnymi dla aktyny F. Kolorem czerwonym wybarwione jest jądro komórki.



Bardzo bogate w informacje są obrazy mikroskopowe uzyskane dzięki wybarwieniu przy pomocy mieszaniny kilku przeciwciał o różnej specyficzności i różnej barwie fluorescencji. Dzięki takim obrazom można wykryć wzajemne relacje pomiędzy rozmieszczeniem różnych organelli i składników komórki. Zdjęcie obok przedstawia komórki wybarwione dwoma rodzajami przeciwciał



(fluorescencja zielona – włókna aktynowe; fluorescencja żółta – mitochondria) oraz specyficznym w stosunku do DNA czerwonym barwnikiem fluorescencyjnym. Charakterystyczne są puste miejsca odpowiadające wakuolom wewnątrzkomórkowym.

Początkowo czynnikiem ograniczającym zakres zastosowania tego sposobu wybarwiania były trudności z uzyskaniem specyficznych przeciwciał ze związanym kowalencyjnie barwnikiem fluorescencyjnym. Problem ten rozwiązano wprowadzając dwa rodzaje przeciwciał.

Przeciwciała I. rzędu, to typowe przeciwciała monoklonalne o dużej specyficzności rozpoznające określone antygeny wybarwiającej komórki. Przeciwciała takie można uzyskać z wykorzystaniem komórek immunologicznie kompetentnych pochodzących od różnych zwierząt. **Przeciwciała II. rzędu** związane są z barwnikami fluorescencyjnymi i rozpoznają przeciwciała zawierające antygeny specyficzne dla poszczególnych gatunków zwierząt.

Wygląda to na niepotrzebną komplikację, a jednak umożliwia łatwe zaprojektowanie konkretnego, dowolnie skomplikowanego sposobu wybarwiania. Nie bez znaczenia jest również fakt, że system ten umożliwia komercyjne wytwarzanie różnorodnych przeciwciał obu rzędów, co znacznie ułatwia prace badawcze.

~~~~~  
Przykład:

*Chcemy wybarwić w komórce dwa różne składniki cytoszkieletu: włókna aktynowe i mikrotubule. W ofercie firmy dostarczającej przeciwciała znajdujemy:*

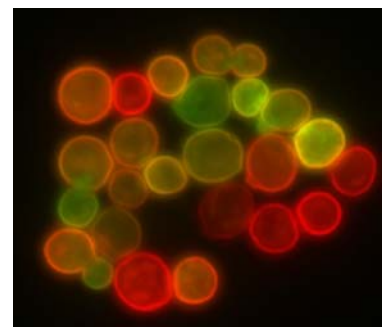
- przeciwciała monoklonalne w stosunku do aktyny pochodzące z komórek:
  - kozich (Ak)
  - owczych (Ao)
- przeciwciała monoklonalne w stosunku do tubuliny (składnik mikrotubul) pochodzące z komórek:
  - świńskich (Tś)
  - owczych (To)
- przeciwciała w stosunku do przeciwciał kozich z barwnikiem o fluorescencji:
  - zielonej (kz)
  - żółtej (kż)
  - czerwonej (kcz)
- przeciwciała w stosunku do przeciwciał owczych z barwnikiem o fluorescencji:
  - zielonej (oz)
  - niebieskiej (on)
  - czerwonej (oc)
- przeciwciała w stosunku do przeciwciał świńskich z barwnikiem o fluorescencji:
  - niebieskiej (śn)
  - żółtej (śż)
  - zielonej (śz)

*Dokonując zakupu na przykład owczych przeciwciał w stosunku do aktyny (Ao) i świńskich przeciwciał w stosunku do tubuliny (Tś) (przeciwciała I. rzędu) oraz fluoryzujących na zielono przeciwciał w stosunku do przeciwciał owczych (oz) i fluoryzujących na żółto przeciwciał w stosunku do przeciwciał świńskich (śż) otrzymujemy wymagany system barwiący. Po jego zastosowaniu włókna aktynowe świecić będą na zielono {Ao-oz}, a mikrotubule na żółto {Tś-śż}.*

~~~~~

Białka fluorescencyjne

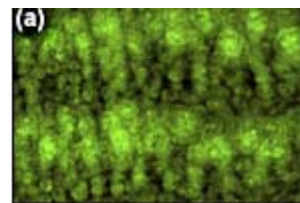
Podczas badań nad morskimi organizmami głębinowymi odkryto szereg białek wykazujących naturalną fluorescencję. Pierwszym z tych białek było białko o zielonej fluorescencji (GFP, ang. Green Fluorescence Protein). Obecnie znane są już białka o fluorescencji w kolorze niebieskim (BFP), żółtym (YFP) i



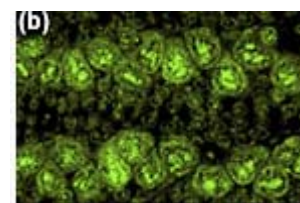
czerwonym (RFP). Są to wszystko niewielkie białka łatwe do manipulacji technikami inżynierii genetycznej. Dołączenie takiego białka do wektora transfekującego przenoszącego inne białko pozwala wygodnie śledzić ekspresję badanego białka: tylko komórki w których doszło do ekspresji białka transfekującego będą zawierały białka fluorescencyjne. Zdjęcie powyżej pokazuje komórki drożdży do których wprowadzono dwa różne wektory. Jeden zawierał GFP, a drugi RFP. Jednoczesna ekspresja obu genów przejawia się fluorescencją o wypadkowej barwie od żółtej do pomarańczowej.

Mikroskopia konfokalna

Jednym z istotnych ograniczeń klasycznej mikroskopii optycznej (zarówno transmisyjnej jak i fluorescencyjnej) jest światło pochodzące spoza płaszczyzny ogniskowania. Obiektyw mikroskopu zbiera obrazy nie tylko z płaszczyzny ogniskowania, ale z całego przekroju próbki. Obraz obiektów leżących w płaszczyźnie ogniskowania jest ostry i wyraźny. Obrazy obiektów leżących przed i za tą płaszczyzną są nieostre (rozmyte) i to tym bardziej im dalej od tej płaszczyzny leżą. W efekcie wypadkowy obraz obiektu obserwowany w klasycznym mikroskopie charakteryzuje się wysokim tłem zmniejszającym ostrość konturów (zdjęcie obok).



Założeniem mikroskopii konfokalnej jest wyeliminowanie obrazów pochodzących spoza płaszczyzny ogniskowania. Uzyskany w efekcie obraz warstwiczny charakteryzuje się słabszym tłem i ostrzejszymi konturami (zdjęcie obok). Pozwala to stosować większe powiększenia i ułatwia interpretację uzyskanych obrazów. Dodatkową zaletą mikroskopii konfokalnej jest możliwość uzyskania obrazów warstwicznych dla kolejnych przekrojów obiektu poprzez zmianę położenia płaszczyzny ogniskowania. Zestaw takich obrazów warstwicznych pozwala odtworzyć trójwymiarowy obraz obiektu wraz z jego budową wewnętrzną.



Zasada działania

Źródłem światła w mikroskopii konfokalnej jest laser zapewniający skupioną wiązkę światła o dostatecznie dużej intensywności. Wiązka ta jest ogniskowana na obserwowanym obiekcie.

Zasada pracy mikroskopu konfokalnego jest zupełnie odmienna od mikroskopu optycznego, zarówno transmisyjnego, odbiciowego jak i fluorescencyjnego. W [mikroskopach optycznych](#)

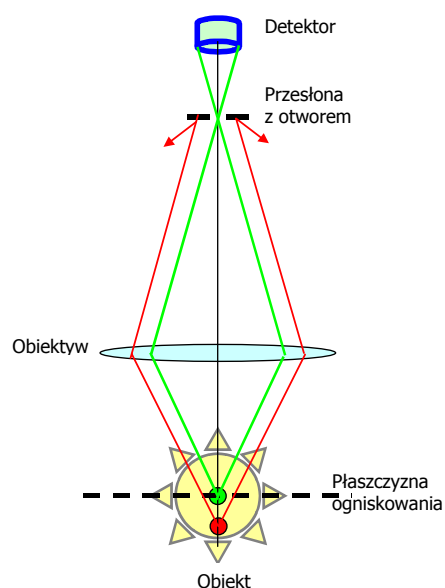
oświetlany jest cały obserwowany obiekt i tworzony jednocześnie cały obraz tego obiektu. W **mikroskopie konfokalnym** wiązka lasera skupiana jest na pojedynczym punkcie obserwowanego obiektu. Światło odbite od tego punktu (lub emitowane z niego w przypadku znacznika fluorescencyjnego) przechodzi przez układ optyczny (obiektyw) zogniskowany na pewnej płaszczyźnie prostopadłej do osi optycznej i trafia do detektora. Obraz obiektu tworzony jest metodą „punkt po punkcie” dzięki skokowemu przemieszczaniu się wiązki po obiekcie obserwacji.

Promienie światła pochodzące z płaszczyzny ogniskowania (linie zielone na rysunku), po przejściu przez obiektyw przecinają się w pewnym punkcie osi optycznej. Promienie pochodzące spoza płaszczyzny ogniskowania (np. linie czerwone na rysunku) przecinają się w innym punkcie. Jeżeli w punkcie przecięcia się promieni z płaszczyzny ogniskowania umieścimy przesłonę z bardzo małym otworkiem, to do detektora dotrą tylko promienie z tej płaszczyzny. Promienie pochodzące z innych miejsc obiektu zostaną przez przesłonę odbite lub pochłonięte.

Zmieniając położenie przesłony z otworem wzdłuż osi optycznej uzyskuje się zmianę płaszczyzny ogniskowania.

Pozwala to na uzyskanie szeregu „przekrojów” badanego obiektu na różnej głębokości. Zbiór takich przekrojów umożliwia, dzięki cyfrowej obróbce danych, stworzenie trójwymiarowego obrazu analizowanego obiektu.

Detektorem w mikroskopie konfokalnym jest niskoszumowy fotopowielacz rejestrujący w formie cyfrowej natężenie światła, które przeszło przez przesłonę. Zmieniając kierunek wiązki laserowej otrzymujemy informację o natężeniu światła pochodzącego z różnych punktów płaszczyzny ogniskowania. Ostateczny obraz przekroju obiektu w płaszczyźnie ogniskowania tworzony jest przez cyfrową obróbkę zgromadzonych danych i wyświetlany na ekranie monitora o wysokiej rozdzielczości. Jeżeli obraz ma zostać zachowany, to przekształca się go w postać typową dla zdjęć cyfrowych. W tej postaci może być przechowywany i dodatkowo opracowywany (np. kolorowany) cyfrowo, a jego ostateczna postać może być utrwalona na drukarce lub papierze fotograficznym.

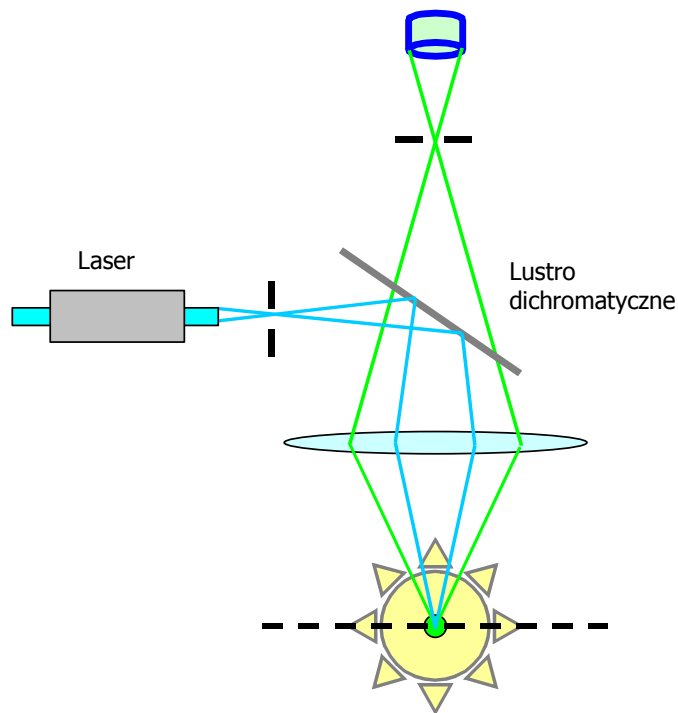


Rozwiązania konstrukcyjne

We współczesnych mikroskopach konfokalnych stosuje się dwa odmienne rozwiązania konstrukcyjne. W obydwu otrzymuje się obraz przekroju obiektu na określonej głębokości, jednakże obrazy te otrzymywane są w odmienny sposób.

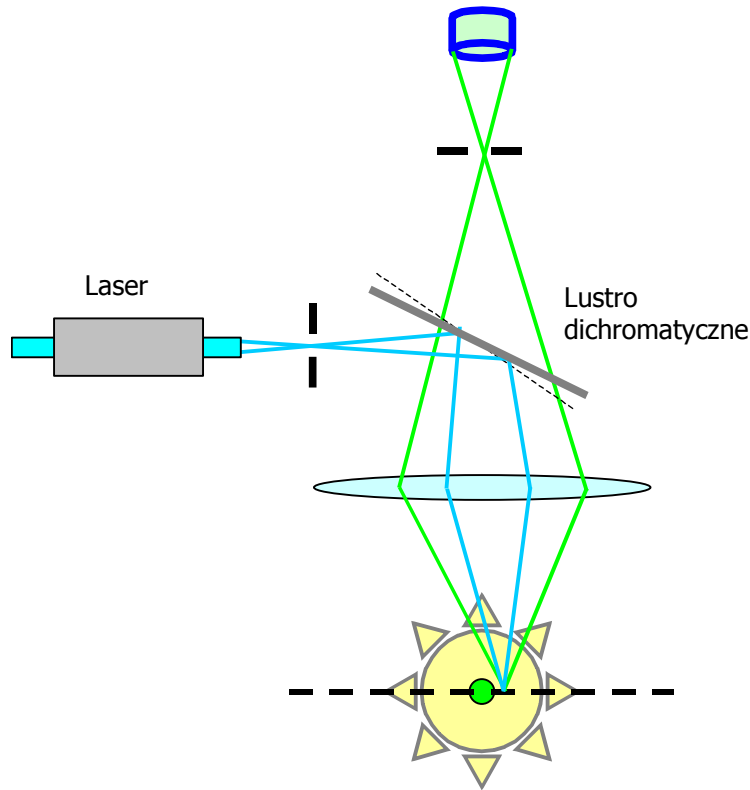
Metoda LSCM

W laserowym skanującym mikroskopie konfokalnym (ang. *Laser Scanning Confocal Microscope*) skupiona wiązka światła laserowego przemieszcza się skokowo po obiekcie. Na swojej drodze wzbudza ona cząsteczki fluorochromów do emisji. Aby uzyskać możliwie silne skupienie wiązki w płaszczyźnie ogniskowania, na drodze optycznej umieszczona jest przesłona z niewielkim otworkiem. Wiązka po przejściu przez otworek w przesłonie trafia na lustro dichromatyczne. Lustro to odbija światło wiązki wzbudzającej, a przepuszcza światło emitowane przez fluorochrom (o większej długości fali). Wiązka wzbudzająca przechodzi następnie przez obiektyw, który ostatecznie skupia ją w postaci mikroskopijnej plamki na płaszczyźnie ogniskowania.



Światło emitowane przez cząsteczki fluorochromu przechodzi przez obiektyw, lustro dichromatyczne (bez odbicia) i trafia na drugą przesłonę z otworkiem. Promienie, które pochodzą z płaszczyzny ogniskowania, przechodzą przez otworek i trafiają do detektora, pozostałe zatrzymywane są na przesłonie.

Zmiana położenia lustra dichromatycznego pozwala zmienić położenie punktu skupienia wiązki na płaszczyźnie ogniskowania (rysunek poniżej). Położenie lustra kontrolowane jest przez system komputerowy, który jednocześnie zapisuje położenie plamki świetlnej i natężenie światła rejestrowane przez detektor. Systematyczne przemiatanie (skanowanie) płaszczyzny ogniskowania pozwala uzyskać informację o analizowanym obiekcie.



Metoda TPCM

W dwufotonowych mikroskopach konfokalnych (TPCM, ang. *Two-photon Confocal Microscope*) do wzbudzenia fluorochromu stosuje się promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni o energii kwantu równej połowie energii wzbudzenia. W takich warunkach wzbudzenie cząsteczki fluorochromu nastąpi tylko wtedy, gdy cząsteczka zaabsorbuje prawie jednocześnie dwa kwanty promieniowania. W praktyce zjawisko takie zachodzi tylko w miejscu silnego zogniskowania wiązki. Dlatego w mikroskopach dwufotonowych nie jest potrzebna przesłona z otworkiem przed detektorem - i tak emitowane światło pochodzi wyłącznie z płaszczyzny ogniskowania.

Laser wytwarza krótkie impulsy promieniowania o dużej gęstości fotonów (dziesiątki kW w maksimum impulsu), jednakże o niskiej energii impulsu (nJ na impuls).

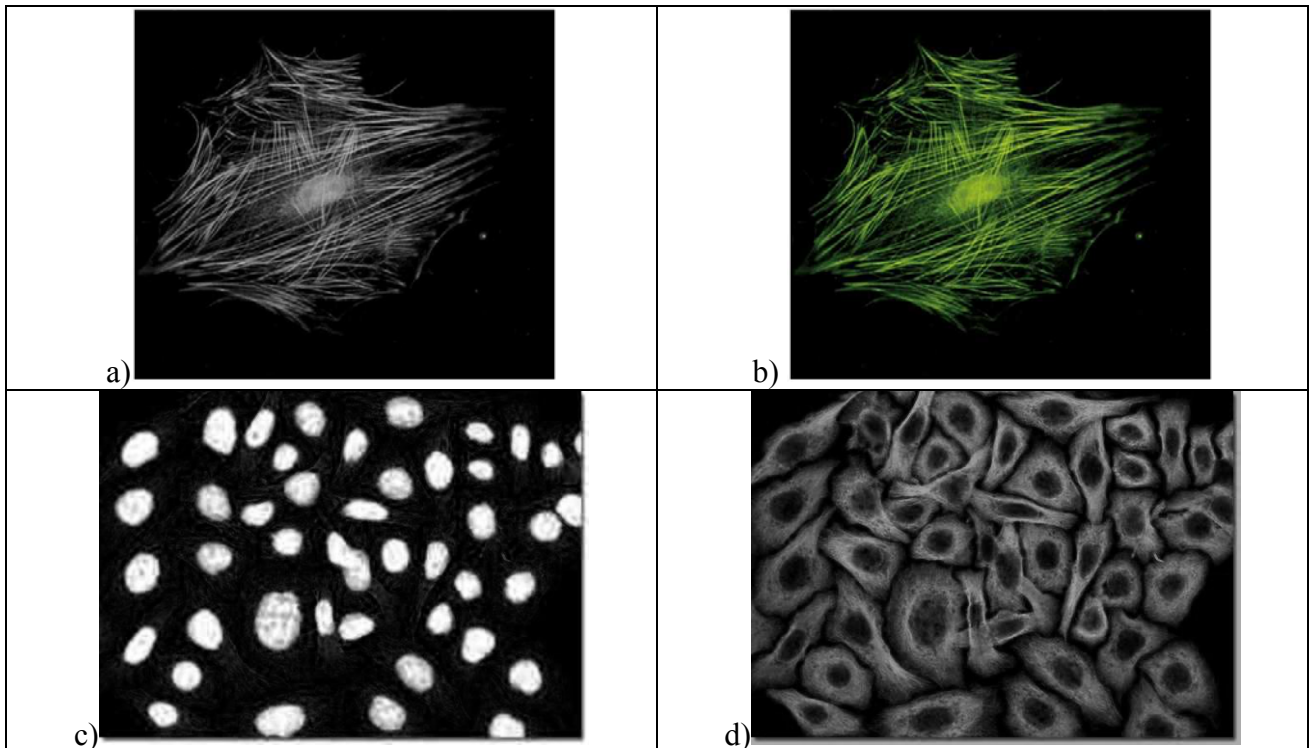
Zasada skanowania obiektu jest w tej konstrukcji analogiczna jak w mikroskopie ze skanowaniem laserowym.

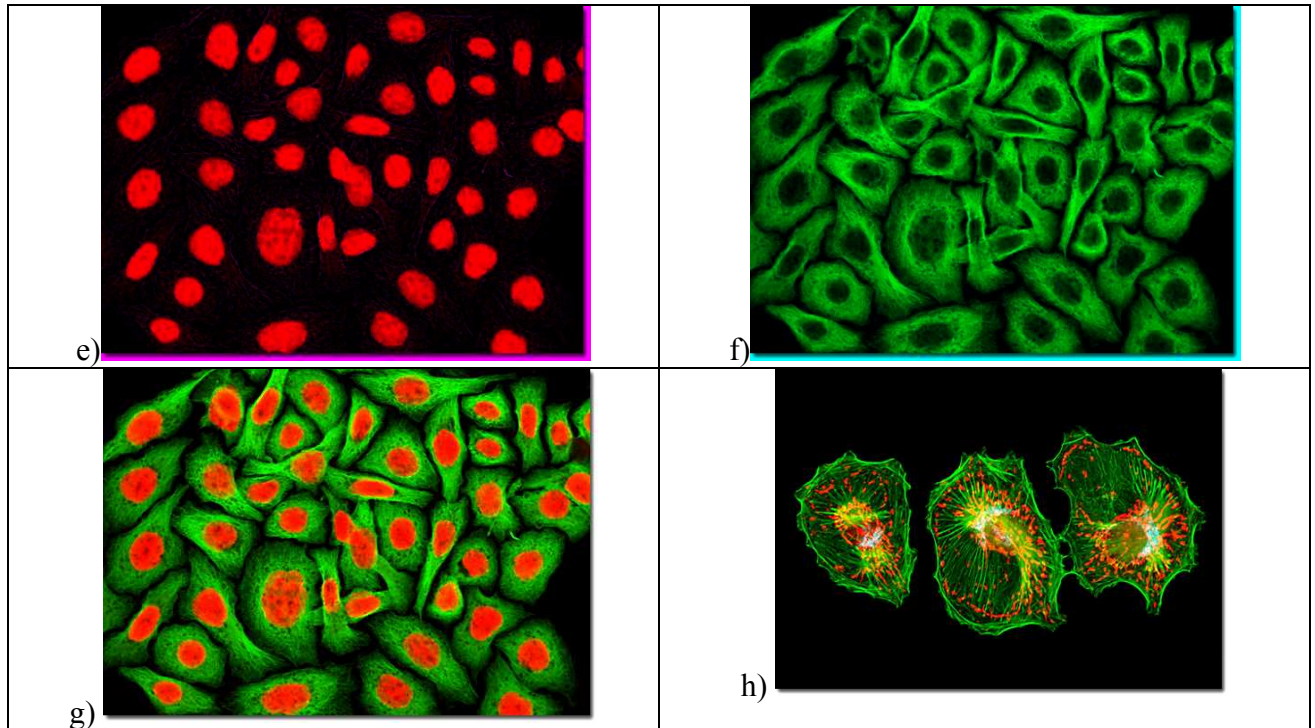
Mikroskopy dwu- lub wielofotonowe mają szereg zalet wynikających ze stosowania wiązki wzbudzenia z zakresu bliskiej podczerwieni:

- niska energia niesiona przez wiązkę powoduje znacznie mniejsze uszkodzenie fotochemiczne i termiczne obiektu
- promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni lepiej penetruje preparaty biologiczne niż krótkofalowe światło widzialne lub promieniowanie UV. Umożliwia to pracę z grubszymi obiektami
- technika ta charakteryzuje się większą czułością niż LSCM, co pozwala pracować z niższymi stężeniami fluorochromów

Obrazowanie

Dane o analizowanym obiekcie zbierane są w formie intensywności świecenia danego punktu i ze swej natury są monochromatyczne, rys. a). Po zebraniu kompletu danych obraz przetwarzany jest w format typowy dla zdjęć cyfrowych. W tej formie może być łatwo kolorowany, rys. b). Jeżeli obiekt barwiony jest więcej niż jednym fluorochromem, to muszą się one różnić długością fali światła wzbudzającego. Dla każdej długości fali zbierane są niezależne dane o obiekcie (monochromatyczne, rys. c) i d)). Emisji pochodzącej od poszczególnych fluorochromów przypisuje się zwykle kontrastowe barwy, rys. e) i f). Dane te kompiluje się w jeden obraz na etapie tworzenia zdjęcia cyfrowego, rys.g).





Obrazy uzyskane dzięki zastosowaniu mikroskopii konfokalnej charakteryzują się przede wszystkim niespotykaną wcześniej rozdzielczością i kontrastem, rys. h). Kolorem zielonym pokazano obraz uzyskany dzięki fluorescencji fluorochromu przyłączonego do przeciwciał specyficznych w stosunku do aktyny, kolorem czerwonym w stosunku do białka zawartego w błonie zewnętrznej mitochondriów, a kolorem niebieskim w stosunku do aparatu Golgiego. W chwili obecnej dostępne są handlowo mikroskopy konfokalne pozwalające na wzbudzenie przy 3 lub więcej zakresach fal. Wraz z rozwojem oferty dostępnych fluorochromów i wzrostem ich specyficzności mikroskopia konfokalna staje się rutynowo dostępną techniką badawczą dostarczającą ogromnych ilości bardzo szczegółowej informacji.

W chwili obecnej możliwe jest uzyskanie pojedynczego skanu w czasie poniżej 0,05 s. Pozwala to rejestrować przebieg szybkozmiennych procesów w żywej komórce lub tkance i obserwować je potem w formie filmu wideo.

Niedostępną innymi technikami przewagą mikroskopii konfokalnej jest możliwość uzyskania serii przekrojów badanego obiektu na różnych głębokościach. Taka seria przekrojów może być wykorzystana do odtworzenia przestrzennej struktury obiektu.

Mikroskopia elektronowa

Podstawowym ograniczeniem mikroskopii optycznej jest występowanie zjawisk dyfrakcji i interferencji. Najmniejsze obserwowane obiekty muszą mieć rozmiar większy niż $\frac{1}{2}$ długości fali. Dla światła widzialnego oznacza to, że nie można zaobserwować obiektów mniejszych niż ok.

200 nm (0,2 μm). Tym samym wielu ważnych organelli komórkowych, np. rybosomów, nigdy nie będzie można zobaczyć w mikroskopie optycznym.

Ograniczenie to nie wynika z przyczyn technicznych (jakość soczewek), ale z samej natury światła. Zastosowanie promieniowania ultrafioletowego umożliwia przesunięcie tej granicy do ok. 100 nm, ale jakość optyki kwarcowej (szkło absorbuje promienie UV) pozostawia obecnie wiele do życzenia. Zastosowanie promieniowania elektromagnetycznego o jeszcze mniejszej długości fali (promienie X, γ) napotyka na niemożliwe do pokonania obecnie bariery techniczne: brak jest materiałów z których można by wykonać soczewki lub zwierciadła.

Po odkryciu przez de Broglie'a fal materii pojawiła się możliwość ich wykorzystania w mikroskopii. Ponieważ długość fali materii zależy od pędu cząstki, więc stosując np. wiązkę szybkich elektronów można uzyskać fale materii o długości poniżej 1 nm. W przypadku strumienia naładowanych cząstek rolę soczewek może pełnić odpowiednio ukształtowane pole magnetyczne.

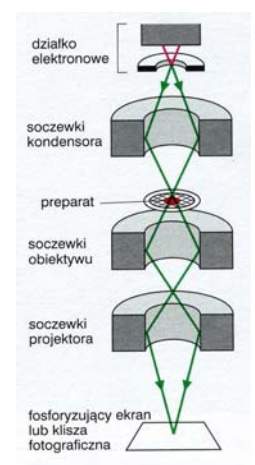
Pierwszy mikroskop elektronowy zbudowano w Niemczech w latach '30 XX w. Zastosowanie tej techniki do układów biologicznych wymagało pokonania szeregu problemów technicznych, tak więc dopiero na początku lat '50 uzyskano pierwsze zdjęcia komórek w mikroskopie elektronowym. Warto zwrócić uwagę, że zamieszczony na zdjęciu obok znacznik skali odpowiada w przybliżeniu długości fali światła widzialnego. Widoczne na zdjęciu ciemne ziarnistości to kompleksy rybosomów na powierzchni retikulum endoplazmatycznego.



Elektronowy mikroskop transmisyjny

Najprostszym typem mikroskopu elektronowego jest mikroskop transmisyjny. Wyrzucany z działka elektronowego strumień elektronów przyspieszany jest różnicą potencjałów rzędu kilkudziesięciu kV i skupiany przez kondensor na badanym preparacie. Przechodząc przez preparat elektrony ulegają pochłonięciu i/lub rozproszeniu. Te które przejdą przez preparat trafiają na układ dwóch soczewek magnetycznych, które ogniskują je na kliszy fotograficznej lub ekranie fluorescencyjnym.

Mikroskopia elektronowa układów biologicznych wymaga specjalnego przygotowania preparatu. We wnętrzu mikroskopu musi panować wysoka próżnia, aby elektrony

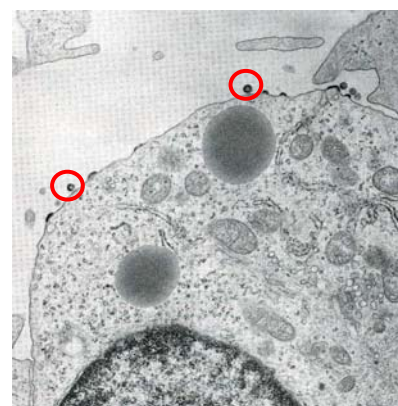


nie rozpraszały się na cząsteczkach powietrza. Ponadto preparat musi być bardzo cienki (poniżej 1 μm). W grubszych warstwach elektrony ulegają rozproszeniu i spowolnieniu co uniemożliwia ich zogniskowanie i otrzymanie ostrego obrazu. Z drugiej strony wiązka elektronów ulega rozproszeniu i spowolnieniu przez materię organiczną prawie niezależnie od jej struktury. Typowe przygotowanie preparatu do elektronowej mikroskopii transmisyjnej obejmuje:

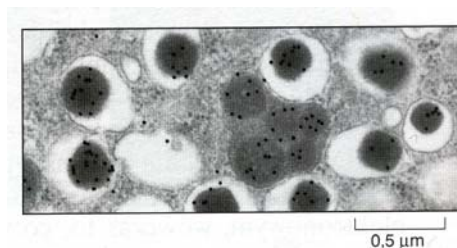
- nasycenie obiektu badań żywicą syntetyczną i jej polimeryzację
- pocięcie bloku żywicy na ultracienkie skrawki
- „wybarwienie” skrawków solami metali ciężkich: ołowiu, uranu, złota

Tym samym w mikroskopie elektronowym obserwujemy elementy struktury komórki różniące się powinowactwem do jonów metali ciężkich. Technika ta umożliwia bardzo szczegółowe poznanie budowy [martwych obiektów biologicznych](#).

We współczesnych mikroskopach elektronowych można uzyskać powiększenie rzędu 1 000 000 razy i rozdzielczość ok. 1 nm. Pozwala to zaobserwować wiele szczegółów wnętrza komórki. Na zdjęciu obok pokazano fragment leukocyta zainfekowanego wirusem HIV. Małe kuliste twory przy powierzchni komórki (w czerwonych kółkach), to cząsteczki wirusa uwalniające się z komórki po namnożeniu.



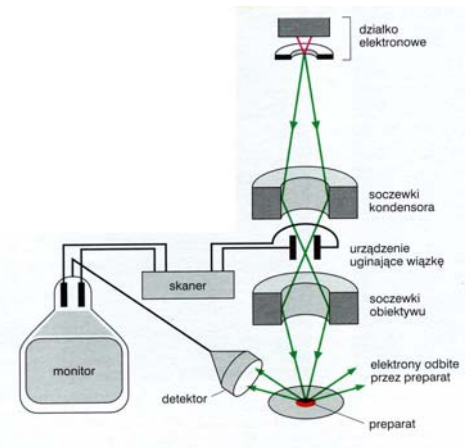
We współczesnej mikroskopii elektronowej układów biologicznych problemem nie jest rozdzielczość, lecz możliwość specyficznego „wybarwienia” wybranych struktur subkomórkowych. Ostatnio podjęto próby zastosowania w tym celu przeciwciał monoklonalnych obarczonych nanocząstkami metali ciężkich. Zdjęcie obok przedstawia fragment komórki trzustki potraktowanej przeciwciałami w stosunku do insuliny. Małe czarne punkciki to nanocząstki złota zawarte w cząsteczkach przeciwciał. Badania tego typu pozwalają określić miejsce występowania insuliny we wnętrzu komórki.



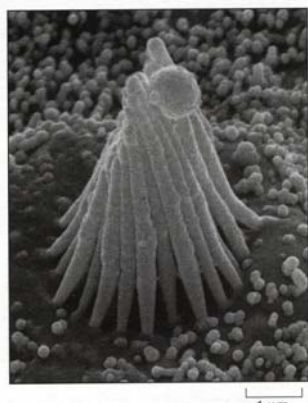
Elektronowy mikroskop skaningowy

Transmisyjny mikroskop elektronowy daje obraz drobnych szczegółów wnętrza komórki, jednak uzyskany obraz jest „płaski”, dwuwymiarowy. Wraz z rozwojem wiedzy o wewnętrznych strukturach komórkowych zaczęły się pojawiać przesłanki, że istotną rolę w funkcji tych struktur odgrywa ich kształt.

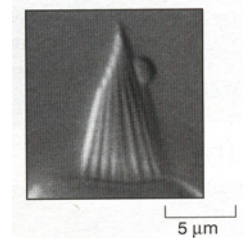
Źródłem informacji o kształtach struktur subkomórkowych może być skaningowy mikroskop elektronowy. Skupiona wiązka elektronów przemieszcza się skokowo (skanuje) po powierzchni analizowanego obiektu. Część wiązki zostaje odbita i rozproszona. Te właśnie elektrony wykrywane są przez detektor i stanowią podstawę do stworzenia „przestrzennego” obrazu obiektu. Przestrzenny charakter obrazu wynika z ustalonego z góry położenia detektora. Liczba elektronów trafiająca do niego zależy bowiem w znacznym stopniu od pochylenia powierzchni obiektu oraz od efektu cienia. Obraz uzyskany z elektronowego mikroskopu skaningowego jest w takim samym stopniu obrazem „przestrzennym” jak fotografia budynku wykonana w słoneczny dzień.



Ponieważ badanie próbki odbywa się w wysokiej próżni, musi być ona odpowiednio spreparowana. Jedną z częstych technik preparowania próbek pochodzenia biologicznego jest liofilizacja niskotemperaturowa. Pozostała po liofilizacji substancja organiczna raczej hamuje niż odbija szybkie elektrony, dlatego aby uzyskać ostry obraz obiektu należy go najpierw pokryć cienką warstwą metalu, tzw. **repliką**. Dokonuje się to techniką napyłania próżniowego. Uzyskana replika jest na tyle trwała, że może być przechowywana nawet latami i wielokrotnie wykorzystywana do uzyskiwania obrazów, np. pod różnymi kątami.



Jako przykład możliwości skaningowej mikroskopii elektronowej przedstawię badania dotyczące struktur czuciowych w uchu wewnętrznym. Komórki zmysłowe wyściełające wnętrze ślimaka posiadają na swojej powierzchni struktury zwane stereociliami. Obraz tych struktur w mikroskopie optycznym na granicy jego rozdzielczości przedstawia zdjęcie po prawej. Ta sama struktura badana w skaningowym mikroskopie



elektronowym ujawnia swoją bardzo urozmaiconą strukturę wewnętrzną i bardzo charakterystyczny kształt (zdjęcie po lewej). Widoczny obok zdjęcia znaczek skali odpowiada odległości 1 μm .