

Optická mikroskopie od van Leeuwenhoeka k Nobelově ceně za chemii v roce 2014

Jaromír Plášek

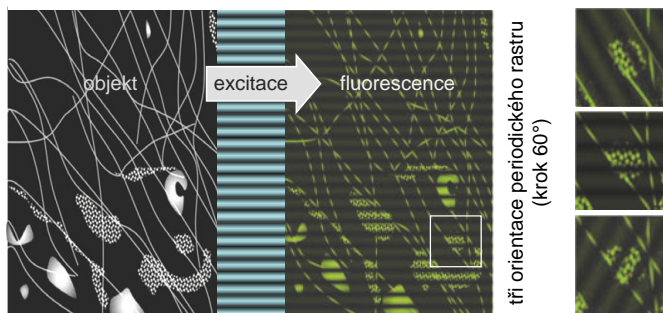
Matematicko-fyzikální fakulta UK, Ke Karlovu 3, 121 16 Praha; plasek@karlov.mff.cuni.cz

Díky optické mikroskopii mohla vzniknout buněčná biologie. Významnou roli hraje tato mikroskopie též v materiálovém výzkumu a dalších vědních oborech, jakož i v mnoha praktických činnostech. Od konce 19. století je zásluhou Lorda Rayleigha a Ernsta Abbeho známo, že rozlišovací schopnost standardních optických mikroskopů je rovna zhruba polovině vlnové délky použitého světla. V uplynulém čtvrtstoletí však vzniklo několik převratných metod, které zlepšily rozlišovací schopnost optických mikroskopů natolik, že místo o mikroskopii můžeme dnes již mluvit o nanoskopii.

Lidský zrak, zvětšující optické přístroje a difrakční hranice rozlišovací schopnosti mikroskopů

Až 80 % informací o okolním světě nám přináší světlo skrze obrazy vznikající na oční sítnici, ze které informace proudí dál přes zrakový nerv do mozku s rychlostí blízkou 10 Mb/s [1, 2]. Kvůli ohybu světla na kruhovém otvoru oční pupily a konečné velikosti fotocitlivých receptorů se však rozlišovací schopnost lidského oka za optimálních podmínek nanejvýše blíží jedné úhlové minutě, což přibližně odpovídá objektu o velikosti 70 μm vzdálenému od oka 250 mm. Menší objekty je proto možné pozorovat pouze pomocí zvětšujících optických přístrojů – jednoduché lupy nebo mikroskopu složeného z objektivu a okuláru.

Běžně používané lupy tvořené jednoduchou spojovou čočkou zvětšují 3 \times až 10 \times . Pokud bude lupou miniaturní skleněná kulička o průměru kolem 2 mm, může zvětšení dosáhnout až hodnoty 250. Takové kuličky se naučil brousit a skrz ně pozorovat nejrůznější objekty holandský samouk Antony van Leeuwenhoek, který o svých pozorováních publikoval ve druhé polovině 17. století celkem 122 sdělení v *Philosophical Transactions of the Royal Society* (viz <https://royalsociety.org/collections/>). Ve složeném mikroskopu, jehož princip vynalezli otec a syn Janssenové v holandském Middleburgu koncem 16. století, se navzájem násobí zvětšení obrazu vytvářeného objektivem se zvětšením okuláru, kterým jako lupou pozorujeme obraz vytvořený objektivem. Takto lze dosáhnout velkého zvětšení i komfortnějších podmínek pozorování mnohem snáze než s miniaturními skleněnými kuličkami. Avšak už Robert Hooke (1635–1703), další z pionýrů mikroskopie a autor proslulého díla *Micrographia* [3], si uvědomil, že použití více čoček vede kromě lepšího zvětšení také k nežádoucímu zvýraznění vad zobrazení – konkrétně vady sférické a ze-



Obr. 1 Schematické znázornění způsobu osvětlení vzorků při metodě SIM.

jména pak vady barevné, kvůli které nelze jednoznačně zobrazit kontury pozorovaných objektů. Jeho úchvatné kresby mikroskopických objektů nejsou proto věrnými reprodukcemi toho, co mohl ve svém nedokonalém mikroskopu skutečně spatřit. Jedná se o kreativní syntézu mnoha pozorování objektů při jejich různé orientaci a osvětlení, viz např. známý obraz blechy.

Kvůli zmíněným vadám zobrazení se složený mikroskop stal všeobecně uznávaným a masivně používaným nástrojem vědeckého bádání až během 19. století, kdy se podařilo dostatečně úspěšně korigovat jak vadu barevnou, tak vadu sférickou. S rostoucí kvalitou korekcí se také postupně dařilo zlepšovat rozlišovací schopnost složených mikroskopů. Ještě před koncem 19. století však nezávisle na sobě ukázali Lord Rayleigh a Ernst Abbe, že maximální rozlišovací schopnost těchto přístrojů je omezena difrakčními jevy, které jsou důsledkem vlnové povahy světla. Bodový objekt se proto zobrazí jako trojrozměrný difrakční obrazec, kterému říkáme impulzová odezva (anglicky *point spread function*, PSF). Průřez PSF s rovinou zaostřeného obrazu má podobu Airyho disku obklopeného sadou koncentrických kroužků, jejichž jas progresivně klesá s pořadovým číslem vedlejšího maxima.

Standardní mikroskopii lze charakterizovat jako způsob celoplošného zobrazování (v angličtině se používá termín *wide-field microscopy*), které se vyznačuje tím, že všechny body zobrazovaného objektu pozorujeme současně. Konvenční rozlišovací schopnost optického mikroskopu definovaná Rayleighem pak odpovídá takové vzdálenosti dvou bodů, při které se polohy maxim jejich Airyho disků nacházejí v místě prvního minima sousední PSF. Obdobně lze definovat také rozlišovací schopnost mikroskopu ve směru kolmém na rovinu obrazu (alternativně označovanou jako axiální, longitudinální nebo vertikální) jako vertikální vzdálenost prvního lokálního minima trojrozměrné PSF od jejího centrálního maxima. Pro nekoherentní záření platí, že laterální rozlišovací schopnost d (v rovině obrazu) a vertikální rozlišovací schopnost d_z optického mikroskopu jsou při celoplošném zobrazování rovny

$$d = 0,61\lambda/NA, \text{ resp. } d_z = 2n\lambda/(NA)^2, \quad (1a,b)$$

kde λ je vlnová délka světla ve vakuu a NA numerická apertura objektivu definovaná známým výrazem $NA = n \sin \alpha$ (n je index lomu prostředí mezi objektivem a krycím sklíčkem preparátu, α je polovina maximálního vrcholového úhlu kužele paprsků přicházejících do objektivu z bodu ležícího na optické ose mikroskopu). Z těchto vztahů plyne, že ani za optimálních podmínek reprezentovaných použitím fialového světla o vlnové délce ~ 400 nm a současných špičkových imerzních objektivů o vysoké numerické apertuře nedosahuje laterální rozlišovací schopnost optických mikroskopů v běžném celoplošném módu hodnot lepší než ~ 180 nm.

Alternativou k celoplošnému zobrazování je mikroskopie skenovací, při které zobrazujeme objekt bod po bodu pomocí fokusovaného světelného paprsku. Nejvýznamnější metodou z této skupiny je konfokální mikroskopie, při které je pozorovaný vzorek skenován bodovým zdrojem světla a světlo odražené nebo fluorescence se dostávají k detektoru až po průchodu konfokální dírkovou aperturou. Tato apertura účinně potlačuje světlo

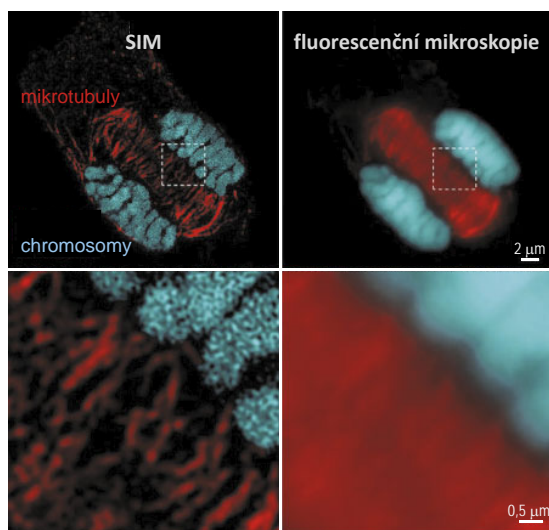
pocházející z nezaostřených mimoohniskových rovin, což umožňuje zobrazovat optické řezy trojrozměrnými vzorky, viz například [4, 5]. Velká většina současných konfokálních mikroskopů je optimalizována pro fluorescenční mikroskopii s excitací fokusovaným laserovým paprskem. Efektivní impulzová odezva těchto mikroskopů je součinem laterálního profilu intenzity fokusovaného laserového paprsku a PSF objektivu. Rozlišovací schopnost konfokálních mikroskopů je proto mírně lepší než při celoplošném zobrazování (o faktor rovnající se $1/\sqrt{2}$). To však ještě konfokální mikroskopii neřadí k superrezolučním metodám. Její hlavní přínos spočívá v potlačení příspěvku rozostřených obrazů mimoohniskových rovin, díky čemuž se můžeme i při zobrazování 3D objektů prakticky přiblížit k teoretickým hodnotám laterální rozlišovací schopnosti optických mikroskopů.

Optická mikroskopie v biologii

Dále se již zaměříme hlavně na aplikace optické mikroskopie v biologii, s nimiž je úzce svázána Nobelova cena za chemii udělená v roce 2014 Stefanu Hellovi, Eriku Betzigovi a Williamu W. Moernerovi, kteří se rozhodujícím způsobem zasloužili o vývoj nových metod superrezoluční optické mikroskopie [6]. Rozlišovací schopnost sotva dosahující hodnoty 180 nm není samozřejmě dostatečná pro studium vnitrobuněčných struktur a v případě bakterií o rozměrech 1–2 μm vlastně ani pro zobrazování celých buněk. Ke studiu jemnějších detailů lze sice použít elektronovou mikroskopii, ta však neumožňuje pozorování živých buněk ani snadnou identifikaci konkrétních proteinů, resp. jiných typů molekul. Superrezoluční optická mikroskopie, které se budeme věnovat níže, kombinuje přednosti optické fluorescenční mikroskopie s vysokou rozlišovací schopností blízkou se v řadě případů rozlišovací schopnosti mikroskopie elektronové.

Při zobrazování struktury buněk nebo komplexních tkání je použití kvalitního mikroskopu pouze jednou z nutných podmínek. Přinejmenším stejně důležitou roli hrají různé histochemické metody barvení vzorků, které vedle zvýšení kontrastu zobrazení jsou často i nástrojem mikroanalýzy chemického složení zobrazovaných struktur. K nejmocnějším histochemickým metodám patří imunohistochemie, která umožňuje prokázat přítomnost určitých molekul (antigenů) ve zkoumaných buňkách pomocí specifických protilátek. Antigeny jsou protilátkami lokalizovány na základě vysoce selektivní interakce antigen-protilátka [7], přičemž k jejich vizualizaci slouží různá barviva navázaná v nejjednodušším případě přímo na molekuly konkrétní protilátky. Velmi efektivní jsou imunofluorescenční metody využívající barviva fluorescenční, neboť pomocí fluorescenčního mikroskopu pozorujeme fluoreskující objekty v kontrastu s relativně tmavým pozadím [8]. Ve srovnání s transmisí mikroskopii preparátů obarvených barvivy zeslabujícími procházející světlo proto postačuje k vizualizaci fluorescenčně označených struktur mnohem menší množství molekul navázaného barviva. Díky rozvoji citlivých detekčních metod je navíc již dokonce možné zaznamenat při fluorescenční mikroskopii emisi jednotlivých fluorochromů [9].

Imunofluorescence není ovšem jedinou biologicky zaměřenou aplikací fluorescenční mikroskopie. Existuje například velké množství fluorescenčních sond pro monitorování fyziologických parametrů živých buněk a tkání. K vizualizaci buněčných struktur se také



Obr. 2 Fragmoplast vzniklý při dělení rostlinné buňky z kořene ječmene. Modrá barva – chromozomy obarvené fluorescenční značkou DAPI, červená barva – mikrotubuly obarvené rhodaminem. Porovnání standardní fluorescenční mikroskopie se SIM obrazem vytvořeným mikroskopem Zeiss Elyra. Převzato z <http://www.ipk-gatersleben.de/en/breeding-research/chromosome-structure-and-function/super-resolution-microscopy/> se souhlasem Dr. V. Schuberta, IPK Gatersleben.

úspěšně používají fluorescenční značky, které se navazují pomocí jiných reakcí, než je reakce antigen-protilátka [10]. Během uplynulých dvaceti let se skupina fluorescenčních značek rozrostla o fluorescenční proteiny, když se podařilo dokázat, že syntéza zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) je možná také v buňkách jiných organismů, než je medúza, ze které tento protein pochází. Postupně bylo vytvořeno několik mutací GFP s fluorescencí odlišných barev a byly objeveny další fluorescenční proteiny z jiných mořských živočichů [11, 12]. Vznikly také rutinní molekulárně-biologické metody umožňující připojovat DNA fluorescenčních proteinů ke genům nejrůznějších bílkovin. V takto modifikovaných buňkách se pak tvoří fúzní bílkoviny s geneticky připojenou fluorescenční sondou. Jelikož fluorescenční proteiny nejsou pro buňky toxické a existují ve více spektrálně rozlišitelných formách umožňujících barevné kódování různých buněčných bílkovin, jsou možnosti jejich použití skutečně fascinující.

Tři hlavní strategie superrezoluční optické mikroskopie (částečně převzato z [13] a [14])

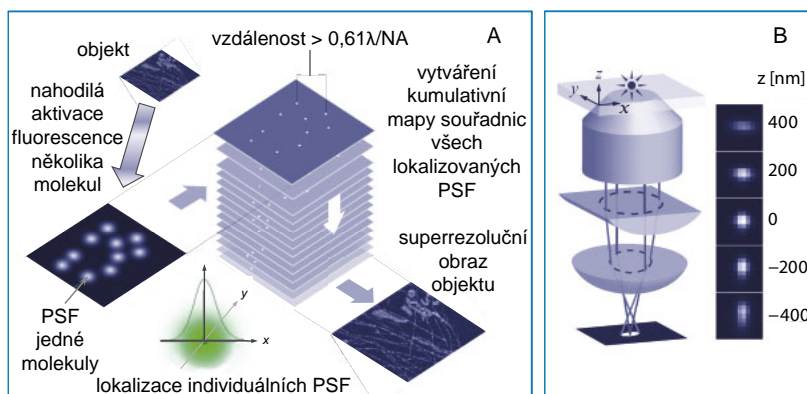
Tři úspěšné strategie, které v současnosti umožňují realizovat superrezoluční mikroskopii na úrovni použitelné v biologickém výzkumu, jsou mikroskopie se strukturálním osvětlením (*Structured Illumination Microscopy* – SIM), jednomolekulová lokalizační mikroskopie (*Single-Molecule Localization Microscopy* – SMLM) a skenovací STED mikroskopie (*STimulated Emission Depletion*).

Mikroskopie se strukturálním osvětlením

Při celoplošném zobrazování objektů emitujících nekoherentní světlo je obraz vytvořený mikroskopem konvolucí PSF s ideálním geometrickým obrazem objektu. Od této skutečnosti se odvíjejí dekonvoluční metody počítačového zlepšování kvality digitalizovaných mikroskopických obrazů, které se opírají o známé vlastnosti Fourierovy transformace konvoluce dvou funkcí. Velmi speciální dekonvoluční metodu představuje mikroskopie se strukturálním osvětlením (obr. 1), která spočívá v osvětlení vzorku excitačním světlem ve formě rastru s harmonickým profilem jasu [15]. Po nasnímání série takových snímků se třemi různými orientacemi excitačního rastru, navíc v kombinaci se třemi až pěti jeho lineárními posunutími o třetinu, resp. pětinu prostorové periody, následuje počítačové zpracování obrazů strukturálně osvětlených objektů směřující ke spektrální extrapolaci Fourierovy transformace 2D obrazu objektu. Tato extrapolace umožňuje zlepšit rozlišovací schopnost na hodnotu blízkou 100 nm, viz např. [14]. Přestože se jedná o pouhé dvojnásobné zlepšení oproti rozlišovací schopnosti dosahované při běžné celoplošné mikroskopii, kvalita obrazů buněk získaných pomocí SIM je impozantní, protože použité matematické zpracování obrazů je spojeno také se zvýšením obrazového kontrastu (obr. 2).

Jednomolekulová lokalizační mikroskopie

Superrezoluční jednomolekulová lokalizační mikroskopie využívá toho, že pokud pozorujeme pouze jednotlivé fluoreskující molekuly, lze je lokalizovat s přesností podstatně větší, než je konvenční rozlišovací schopnost mikroskopu. Přesnost lokalizace jednotlivých molekul samozřejmě výrazně závisí na velikosti obrazového šumu, který klesá s celkovým počtem fotonů ve změřené PSF. Při detekci cca 10^6 fotonů se přes-

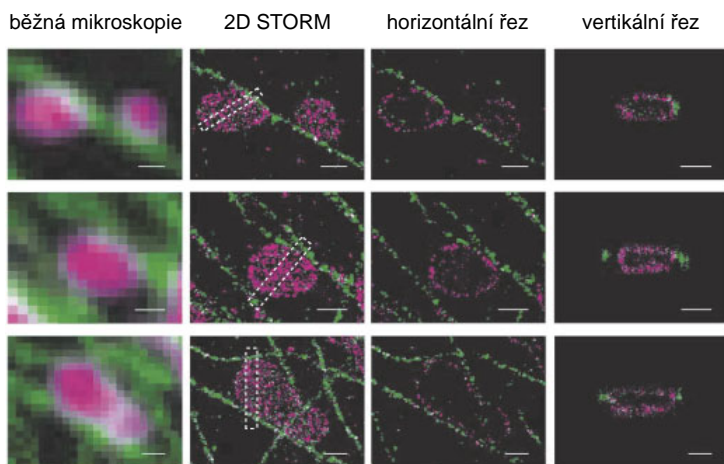


Obr. 3 Princip lokalizační superrezoluční mikroskopie. A) V objektu obsahujícím fotoaktivovatelnou nebo fotoregulovatelnou fluorescenční sondu je malý počet dostatečně navzájem vzdálených fluorochromů nahodile přepnut aktivacím světelným pulzem do fluorescenčního stavu. Z jejich centroidních souřadnic je pak po několika desítkách tisíc opakování takové lokalizace vytvořen superrezoluční obraz distribuce fluorescenční sondy ve studovaném objektu. B) Vertikální lokalizace fluorochromů použitá ve 3D STORM. Zjednodušené optické schéma ilustruje princip určení z-souřadnice fluorochromu z astigmatické formy PSF vznikající po vložení válcové čočky před čočku promítající PSF na citlivou kameru. Zcela vpravo je vertikální kalibrace elipticity astigmatické PSF. *Upraveno podle [25].*

nost lokalizace blíží k 1 nm [16]. Kvůli lokalizaci PSF je však nutné zajistit, aby v daném okamžiku fluoreskovala jen jediná z desítek až stovek molekul nacházejících se uvnitř okruhu o poloměru odpovídajícím konvenční rozlišovací schopnosti mikroskopu. V takovém případě lze po několika tisících až desítkách tisíc opakování postupně lokalizovat všechny molekuly fluorescenční sondy s přesností výrazně lepší, než je běžná rozlišovací schopnost mikroskopu. Tímto způsobem nakonec vznikne mapa rozložení sondy ve vzorku, která představuje superrezoluční obraz fluoreskujícího objektu.

Princip SMLM, který je schematicky znázorněn na obr. 3, byl publikován v roce 2006 nezávisle třemi různými laboratořemi pod názvy PALM – *PhotoActivation Localization Microscopy* [17], FPALM – *Fluorescence PhotoActivation Localization Microscopy* [18] a STORM – *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy* [19]. Jednotlivé varianty SMLM se od sebe liší charakterem použitých fluorochromů a jim odpovídajícími mechanismy generování řídkých souborů fluoreskujících molekul. Například PALM a FPALM používají fotochromní nebo fotoaktivovatelné geneticky kódované fluorescenční proteiny, jako je například Dronpa s fluorochromem, který lze ozařováním intenzivním modrozeleným světlem (≈ 488 nm) opakovaně převádět do nefluoreskující trans-konformace a pak ozařením fialovým světlem (≈ 405 nm) vrátit zpět do silně fluoreskující cis-konformace s maximy excitačního a emisního spektra u 503 nm a 518 nm [20]. Podrobnější přehled různých variant SMLM lze najít v publikacích [21–24].

Veškeré buňky mají trojrozměrnou stavbu, k jejímuž zobrazení je třeba dosáhnout superrozlišení ve třech dimenzích. Na obr. 3 je ukázka jednoho elegantního způsobu 3D lokalizace axiální polohy jednomolekulových PSF, vyvinutého pro metodu STORM. Využívá se k tomu astigmatické zobrazení molekul sondy pomocí válcové čočky přidané do optické soustavy mikroskopu. PSF bodového zdroje se tím změní z kruhové symetrického obrazce na obrazec eliptický, jehož protažení roste se vzdáleností molekuly od zaostřené roviny, a to navíc v navzájem kolmých směrech pro molekuly ležící pod a nad touto rovinou. Mikrotubuly savčích buněk byly takto zobrazeny s laterálním rozlišením 20 až 30 nm



Obr. 4 3D STORM nanoskopie mitochondrií (fialové) a mikrotubulů (zelené) opičích ledvinových buněk BSC-1. K imunofluorescenčnímu značení mitochondrií protilátkou k mitochondriálnímu proteinu Tom20 s a mikrotubulů protilátkou k β -tubulinu byly použity fotoregulovatelné páry kyaninových fluorochromů Alexa405-Cy5 (mitochondrie) a Alexa488-Cy5 (mikrotubuly). Tři náhodně vybraná místa s několika mitochondriemi a tubulinovými vlákny ukazují rozdíl v kvalitě zobrazení pomocí celoplošné mikroskopie, 2D-STORM a 3D-STORM. Vertikální řezy odpovídají horizontální pozici vyznačené bílým čárkovaným rámečkem. Vertikální pozice vybraných ukávek horizontálních řezů nejsou specifikovány. Délka měřítka je 500 nm. Reprinted with permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Methods, copyright 2008, ref. [26].

a axiálním rozlišením 60 až 70 nm [25]. Na obr. 4 převzatém z práce [26] je ilustrován rozdíl mezi imunofluorescenční analýzou prováděnou pomocí klasické celoplošné mikroskopie a superrezoluční 3D-STORM metodou.

Skenovací STED mikroskopie

STED mikroskopie (*stimulated emission depletion*, česky redukce fluorescence stimulovanou emisí) je v podstatě variantou skenovací laserové konfokální fluorescenční mikroskopie se dvěma laserovými paprsky fokusovanými kolineárně do stejného místa vzorku (obr. 5). Jeden z nich slouží k excitaci fluorescence podobně jako při obyčejné konfokální mikroskopii. Druhý paprsek, kterému budeme říkat redukční, má v ohnisku prstencový profil intenzity s prakticky nulovou intenzitou uprostřed. Excitované molekuly nacházející se na periférii excitované zóny ozařované světelným prstencem redukčního paprsku tak mohou být přinuceny k přechodům do základního stavu stimulovanou emi-

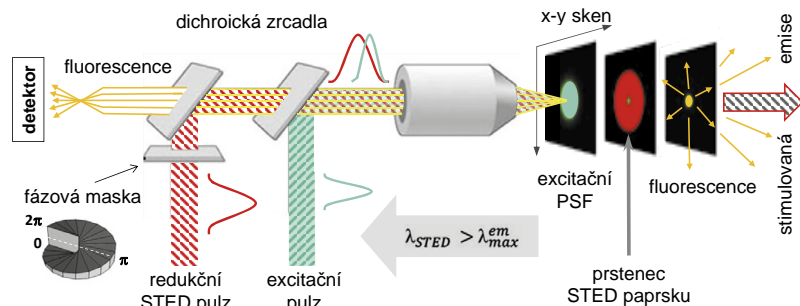
sí místo vyzáření spontánní fluorescence. Rozlišovací schopnost STED mikroskopu je určována průměrem oblasti, v níž zbyly excitované molekuly schopné emitovat spontánní fluorescence, kterou lze od stimulované emise snadno oddělit jak spektrálně, tak i prostorově.

Pravděpodobnost zániku excitovaných stavů stimulovanou emisí roste s intenzitou redukujícího STED paprsku a pro rozlišovací schopnost STED mikroskopu platí

$$d_{STED} \approx \frac{d}{\sqrt{1 + \frac{I_{max}}{I_{sat}}}}, \quad (2)$$

kde d je konvenční rozlišovací schopnost daného objektivu, I_{max} je maximální intenzita v ohniskovém prstenci redukčního paprsku (typicky se jedná o 0,1–1 GW/cm²) a I_{sat} je intenzita, při které stimulovaná emise snižuje kvantový výtěžek spontánní fluorescence na polovinu [27]. Tato rovnice naznačuje, že STED mikroskopie v principu nabízí libovolně velkou rozlišovací schopnost za předpokladu, že bude k vyvolání stimulované emise použito dostatečně intenzivní záření. Prakticky dosažitelná rozlišovací schopnost STED mikroskopů přesto zůstává v nanometrové škále v důsledku více faktorů. Konkrétně se jedná o zbytkové aberace objektivů (při standardní mikroskopii zcela zanedbatelné), rozptyl světla v objemných 3D vzorcích a v neposlední řadě též o fotostabilitu fluorochromů. V případě diamantu s luminiscenčními centry typu dusík-vakance bylo dosaženo laterálního rozlišení ~6 nm, zatímco u biologických vzorků se syntetickými organickými barvivy se jedná o ~20 nm nebo o 50 až 70 nm při použití fluorescenčních proteinů (obr. 6). Při STED mikroskopii je fluorescence z periferie PSF redukována stimulovanou emisí. Později bylo úspěšně demonstrováno, že podobné redukce PSF lze dosáhnout i několika dalšími způsoby, jako je použití fotoregulovatelných fluorochromů (metoda RESOLFT) nebo excitace fluorochromů do metastabilních nefluorescenčních stavů (GSDM) [29, 30].

K vytvoření prstencového profilu intezity v ohnisku redukčního paprsku slouží fázová maska, která mezi definované zóny v příčném průřezu laserového paprsku vnáší fázové rozdíly rovnající se π . K dosažení ostrého centrálního minima STED paprsku, které je optimální z hlediska laterálního rozlišení STED mikroskopu, se používá spirální maska, viz obr. 5. K vytvoření centrálního minima ve vertikálním směru je naopak vhodnější anulární maska ve tvaru prstence s fázovým rozdílem π mezi centrální a periferní zónou. Jedna z možností, jak dosáhnout vysokého 3D rozlišení současně v horizontálním i vertikálním směru, spočívá v rozdělení redukčního STED paprsku do dvou větších odlišnými fázovými maskami (anulární a spirální) a následující rekombinaci obou fázově upravených paprsků [31]. První funkční STED mikroskopy používaly jak pro excitaci, tak pro vyvolání stimulované emise pulzní lasery. Tento typ laserů se vyznačuje dostatečně vysokou intenzitou světelných pulzů při relativně nízké střední energii záření dopadajícího na vzorek, což je příznivý stav z hlediska nežádoucího fotochemického poškození studovaných objektů. Na druhou stranu časová synchronizace světelných pulzů generovaných dvěma lasery představuje zanedbatelný technický problém. Proto se objevily též systémy s kontinuálními STED lasery (*CW-STED*), které však mají nižší rozlišovací schopnost než pulzní systémy. Zatím nejpokročilejší variantou STED mikroskopů jsou mikroskopy s hradlovanou detekcí (*gated STED*,



Obr. 5 Princip STED mikroskopie. Vlevo dole je ilustrace spirální fázové masky vložené do dráhy redukčního paprsku. Díky postupně narůstající tloušťce získají vlny procházející jejími protilehlými segmenty vzájemný fázový posuv odpovídající polovině vlnové délky a po fokusování objektivem mikroskopu spolu rušivě interferují, což vede ke vzniku prstencového rozložení výsledné intenzity světla. Na panelech napravo od objektivu jsou schematicky znázorněna plošná rozložení intenzit excitačního paprsku, STED paprsku a redukované stopy spontánní fluorescence, která zbude po stimulované emisí fluorochromů v periferní zóně excitační stopy. Stimulovaná emise má stejný směr šíření (naznačený šrafovanou šipkou vpravo) i vlnovou délku jako redukční STED paprsek.

g-STED), které dosahují vysoké rozlišovací schopnosti i s kontinuálními STED lasery [32]. Oba hlavní způsoby dosažení vysokého 3D rozlišení – hradlovaná detekce a kombinovaný efekt dvou fázových masek – byly uplatněny v dosud nejvýkonnějším STED mikroskopu firmy Leica Microsystems (model TCS SP8 STED 3X).

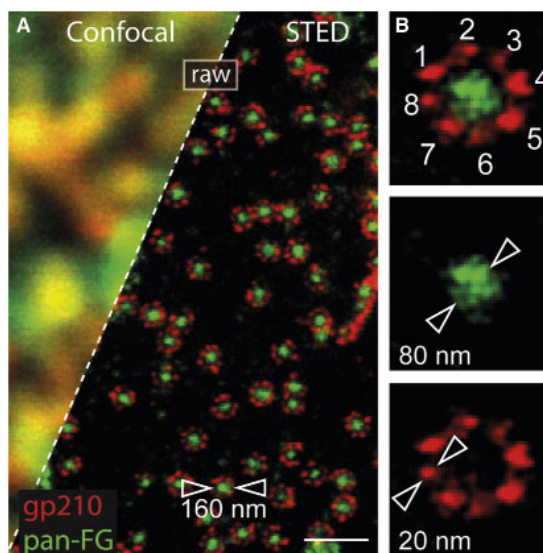
Aplikace a perspektivy superrezoluční mikroskopie

K překvapení mnohých byl pokrok na poli superrezoluční mikroskopie oceněn Nobelovou cenou za chemii, nikoli za fyziku. V této souvislosti je třeba si uvědomit, že k nejvýznamnějším oborům chemie patří biochemie, která studuje chemické složení a vzájemné působení chemických substancí v živých organismech. Od superrezoluční fluorescenční mikroskopie kombinované se specifickým značením buněčných struktur fluorescenčními proteiny i dalšími fluorescenčními sondami se očekává příliv dříve nedostupných poznatků o komplexní souhře buněčných molekul v nanometrovém měřítku. To s vysokou pravděpodobností změni převratným způsobem náš pohled na mnohé biologické procesy, jimiž jsou předurčovány charakteristické znaky a vlastnosti různých forem života.

Již dnes lze najít v literatuře příklady prvních zajímavých výsledků získaných pomocí superrezoluční mikroskopie (např. nový model aktin-spektrinového cytoskeletu nervových vláken [33]), jejichž podrobný přehled však není možné prezentovat v tomto krátkém příspěvku. K dispozici je však řada nedávno publikovaných přehledových článků věnovaných této problematice, například [34–40], včetně tří článků v českém jazyce [13, 14, 41]. Nové superrezoluční metody se v budoucnosti nepochybně uplatní nejen v buněčné biologii, ale i v jiných vědních oborech. Například princip STED mikroskopie byl úspěšně testován jako perspektivní metoda pro nanolitografii produkující detaily o rozměrech blízkých 50 nm [30].

Literatura

[1] C. Haupt, A. B. Huber: *Front. Biosci.* **13**, 3136 (2008).
 [2] K. Koch a kol.: *Curr. Biol.* **16**, 1428 (2006).
 [3] R. Hooke: *Micrographia or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glassess*. Royal Society, London, 1665. Dostupné také na WWW: <http://www.gutenberg.org/files/15491/15491-h/15491-h.htm>.
 [4] www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/
 [5] J. Plášek: *Vesmír* **74**, 4 (1995).
 [6] M. Ehrenberg: *The Nobel Prize in Chemistry 2014 – Press Release*. The Royal Swedish Academy of Sciences, Stockholm 2014.
 [7] E. Maňáková, A. Seichertová: *Metody v histologii*. Karolinum, Praha 2002.
 [8] www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html
 [9] W. E. Moerner: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 12596 (2007).
 [10] <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/molecular-probes-the-handbook.html>
 [11] R. Y. Tsien: *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509 (1998).
 [12] R. N. Day: *M. W. Davidson, Chem. Soc. Rev.* **38**, 2887 (2009).
 [13] J. Plášek: *Bulletin ČSSM* **2**, 47 (2015).
 [14] J. Plášek: *Pokroky MFA* **60**, 19 (2015).
 [15] M. G. L. Gustafsson: *J. Microsc.* **198**, 82 (2000).
 [16] A. Pertsinidis, Y. Zhang, S. Chu: *Nature* **466**, 647 (2010).
 [17] E. Betzig a kol.: *Science* **313**, 1642 (2006).



Obr. 6 Nanoskopické zobrazení proteinových komplexů vytvářejících póry v jaderné bláně žabích buněk. Bylo použito dvojbarevné imunofluorescenční značení protilátkou glykoproteinu gp210 a protilátkami proti komplexu proteinů uprostřed póru (fluorofory Abbeior STAR635P a Atto594). A) Vlevo – póry zobrazené obyčejným konfokálním mikroskopem; vpravo – STED zobrazení pórů s rozlišením ≈ 20 nm (kruhy oktamerů glykoproteinu gp210 zvýrazněné červenou barvou) a ≈ 30 nm (centrální komplexy proteinů jaderného póru zvýrazněné zelenou barvou). Délka bílé úsečky je 500 nm. B) Jeden jaderný pór s oktagonálním komplexem osmi molekul gp210 a centrálním komplexem dalších proteinů o celkovém průměru ≈ 80 nm. *Převzato z [28] with permission from Elsevier, DOI: 10.1016/j.bpj.2013.05.029, copyright (2013).*

[18] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, M. D. Mason: *Biophys. J.* **91**, 4258 (2006).
 [19] M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang: *Nat. Methods* **3**, 793 (2006).
 [20] M. Andresen a kol.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 13005 (2007).
 [21] M. Heilemann a kol.: *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 3801 (2005).
 [22] M. Heilemann a kol.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **47**, 6172 (2008).
 [23] B. L. Haas a kol.: *Molecules* **19**, 12116 (2014).
 [24] M. Bates, T. R. Blosser, X. W. Zhuang: *Phys. Rev. Lett.* **94**, 108101 (2005).
 [25] B. Huang a kol.: *Science* **319**, 810 (2008).
 [26] B. Huang a kol.: *Nat. Methods* **5**, 1047 (2008).
 [27] S. W. Hell: *Science* **316**, 1153 (2007).
 [28] F. Goettfert a kol.: *Biophys. J.* **105**, L1 (2013).
 [29] C. Cremer, B. R. Masters: *Eur. Phys. J. H* **38**, 281 (2013).
 [30] T. A. Klar, R. Wollhofen, J. Jacak: *Phys. Scr.* **T162**, (2014).
 [31] B. Harke a kol.: *Nano Lett.* **8**, 1309 (2008).
 [32] G. Vicidomini a kol.: *Plos One* **8**, e54421 (2013).
 [33] M. Maglione, S. J. Sigrist: *Nat. Neurosci.* **16**, 790 (2013).
 [34] S. W. Hell, in: *Single Molecule Spectroscopy in Chemistry, Physics and Biology*. Edit. A. Graslund, R. Rigler a J. Widengren, Springer-Verlag, Berlin 2010, s. 365.
 [35] B. Huang, H. Babcock, X. W. Zhuang: *Cell* **143**, 1047 (2010).
 [36] A. Kusumi a kol.: *Nat. Chem. Biol.* **10**, 524 (2014).
 [37] B. O. Leung, K. C. Chou: *Appl. Spectrosc.* **65**, 967 (2011).
 [38] G. Patterson a kol.: *Annu. Rev. Phys. Chem.* **61**, 345 (2010).
 [39] D. Toomre, J. Bewersdorf: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 285 (2010).
 [40] K. Weissart a kol.: *Adv. Opt. Techn.* **2**, 211 (2013).
 [41] J. Černý: *Vesmír* **94**, 4 (2015).

» K překvapení mnohých byl pokrok na poli superrezoluční mikroskopie oceněn Nobelovou cenou za chemii, nikoli za fyziku. «