آخرین دستاوردها در ارتقاء وضوح میکروسکوپ نوری: روزنهای برای مشاهدات زیستی در مقیاس نانو

علی دیناری، الناز تمجید* گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

tamjid@modares.ac.ir

چکیدہ

ظهور نانوفناوری بهعنوان یک فناوری نوین با افقهای امیدبخش، همواره با نگرانیهایی در زمینهی ایمنی زیستی و زیست محیطی همراه بوده است. بهویژه آنکه این فناوری با دستکاری مواد در مقیاسهای سلولی و مولکولی، ادعای بهبود عملکرد سامانههای زیستی با اهداف پزشکی و زیست فناورانه را مطرح می سازد. لذا اطمینان از سلامت این نانوسامانهها بر اساس مشاهده مواد و اجزای زیر سلولی و مطالعه دقیق ساز و کارهای عملکرد زیستی آنها در مقیاس نانومتری ضروری به نظر می رسد. مزیت میکروسکوپ نوری به عنوان ابزاری مهم در توسعه علوم، امکان مشاهده نمونههای زنده با حداقل اختلال در عملکرد آنها، انعطاف پذیری، حساسیت و اختصاصیت است. اما پراش نور و تاثیر آن بر وضوح، محدودیت اصلی این میکروسکوپ هاست. اخیرا با توسعه روشهای جدید تصویربرداری با وضوح بسیار آن بر وضوح، محدودیت اصلی این میکروسکوپهاست. اخیرا با توسعه روشهای جدید تصویربرداری با وضوح بسیار تفکیک میکروسکوپ فلورسنت و الکترونی کاهش چشمگیری یافته است. تصاویر حاصل از این روشها، حاوی اطلاعات ارزشمندی در بررسی کروموزوم، نقشهیابی ژنوم، انتقالات غشایی، تقسیم سلولی، آلودگیهای ویروسی و سمیت سلولی است. در این مقاله آخرین پیشرفتهای فناورانه در بهبود وضوح میکروسکوپهای نوری به مقیاس نانو سمیت سلولی است. در این مقاله آخرین پیشرفتهای فناورانه در بهبود وضوح میکروسکوپهای نوری به مقیاس نانو با امید ارتقاء دانش عمومی در حوزههای مختلف پزشکی و زیست شناسی معرفی می شوند.

كلمات كليدى: ميكروسكوپ نورى فلورسنت، وضوح ، پراش، مقياس نانو، ايمني زيست

مقدمه

میکروسکوپ نوری به عنوان یکی از ابزارهای مهم در توسعه علم و فن آوری در نظر گرفته شده است. از زمان اختراع آن در اواخر قرن شانزدهم، این شهرت را بدست آورد که قادر به نمایان کردن اشیائی باشد که با چشم غیر مسلح قابل دیدن نیست. از این رو انواعی

از رشتههای علمی از قبیل بیولوژی، پزشکی، و علم مواد شکل گرفت. توانایی این تکنیک برای اندازهگیری ریخت شناسی سطح، طراحی مرز میکروساختارها و مکانیابی اختصاصی مولکوهای توزیع شده در شرایط in vivo ناشی از تحقیقات

نمونه های زنده، حساسیت و اختصاصیت فوق العاده زیستی، حداقل اختلال در عملکرد نمونه زنده، نمایش مستقيم و نمايان كردن نمونه، انعطاف پذيري و سادگی کار کردن با آن است. بنابراین FFFM یک وسيله ترجيحي براي بررسي موقعيت مكاني اجزاي سلول است. با این وجود پراش ذاتی ابه به عنوان یک مانع قدرت مانور میکروسکوپ نوری برای دریافت اطلاعات مهم ريختشناسي و مكانيابي اجزاي سلولى محسوب مىشود. اخيرا چندين تكنيك تصویربرداری با وضوح عالی توسعه یافتهاند (۲–۲) که با کمک آنها برای سوالهای زیستی حل نشده، جواب های جدیدی بدست آمده است. در این مقاله آخرین دستآوردهای علمی در زمینه دستیابی به وضوح عالى مورد بررسى قرار مى گيرد. همان گونه كه ذکر شد پراش محدود کننده وضوح فضایی است که بهترتيب در جهت وضوح جانبي (Lateral Resolution) به ۲۰۰ نانومتر و در جهت وضوح محوری (Axial Resolution) به ۵۰۰ نانومتر محدود شده است. بدین ترتیب مانعی برای کاربرد میکروسکوپ نوری در شناسایی جزییات ظریف ساختارهای ریز سلولی ایجاد کرده است. تلاشهای گستردهای برای غلبه بر محددیت پراش و بدست آوردن تصویربرداری با وضوح در زیر محدوده پراش بر روی نمونههای بیولوژیکی صورت گرفته است. روشهای زیادی ابداع شده اند که قادرند تصویرهایی با وضوح دلخواه در ابعاد ۱۰ نانومتر یا کمتر ایجاد

مدرن و پیشرفتهای این ابزار است. در واقع بدون میکروسکوپ نوری دانش ما در مورد دنیای میکرو به شدت مختل می شد. با گذشت ۳۰۰ سال از زمان اختراع میکروسکوپ نوری موضوع پراش نور و تاثیر بالقوه آن بر قدرت تفکیک به صورت کاملا جدی باقی مانده است. کمترین فاصله بین دو نقطه را که به وضوح بهعنوان موجودیتهای جداگانه، با میکروسکوپ دیده شود قدرت تفکیک مینامند که به دو عامل طول موج نور مرئی و عدد ضریب دهانه (NA= Numerical aperture) عدسی شیئی سیستم مورد استفاده بستگی دارد. بنابراین حد نهایی تفکیک میکروسکوپهای نوری طول موج نور مرئی (۴۰۰ تا ۷۲۰ نانومتر) است. آقای ارنست ابه در سال ۱۸۷۳ به طور واضحى نشان داد كه محدوده وضوح يك میکروسکوپ حدود نصف طول موج اصلاح شده با ضریب دهانه عدسی شیئی میباشد (۱). در واقع به دلیل ماهیت موجی نور، موجهای مختلف موجود در یک پرتو نور، با یکدیگر تداخل میکنند. به همین دلیل، تمرکز پرتو نور توسط یک عدسی، بسته به طول موج نور و زاویهای که عدسی می تواند نور را جمع آوری کند، یک نقطه نورانی به پهنای ۲۰۰ نانومتر در جهتهای X و Y و عمق ۵۰۰ نانومتر در راستای Z تشكيل مىدهد. ميكروسكوپ فلورسنت ميدان دور (FFFM) از انواع پیشرفته میکروسکوپهای نوری است. تقدم و پیشتازی این نوع میکروسکوپ به علت مزاياي منحصر بهفرد آن از جمله توانايي كار با

کنند. به طور کلی تکنیکهای با وضوح بسیار بالا (Super-Resolution Imaging) به ۳ نوع اصلی تقسیم میشوند.

اولین نوع از روشهای تصویربرداری با وضوح بسیار بالا مبتنی بر نور الگو یافته است. این روش از طریق روشنایی الگو یافته وضوحی در زیر محدوده پراش را برای کنترل فقط چند مولکول که بهطور همزمان برانگیخته و آشکار میشوند، حاصل میکند. از جمله روشهای میکروسکوپی این گروه میتوان به STED SSIM و RESOLFT technology و اشاره کرد.

نوع دوم روش های تصویربرداری با وضوح بالا مبتنی بر مکان یابی (محلیسازی) تک مولکول است که مولکول های منفرد (مستقل) را در زمان های متفاوت فعال میکند. این گروه به طور عام شامل STORM و PALM است.

نوع سوم روش های تصویربرداری بر پایه بی رنگ شدن (Blinking)و چشمک زدن (Blinking) است که شامل تصویربرداری با وضوح عالی مبتنی بر تک مولکول های فلورسنت به واسطه بی رنگ شدن نوری (SHRImP)، مکانیابی تک مولکول های سیگنال دهنده توسط بلیچ شدن /چشمک زدن (BaLM) و همچنین روش تصویربرداری با وضوح عالی توسط نوسانات نوری (SOFI) است. در ادامه هر کدام از روش های فوق الذکر به اختصار مورد بحث و بررسی

تصویربرداری با وضوح بسیار بالا مبتنی بر نور الگو یافته

الف– ميكروسوپ STED

قرار مي گيرد.

در میکروسکوپ STED (کاهش نشر تحریک شده) به طور مستقیم با کاهش تاثیر تابع نقطه گستر (-Point (spread function (PSF) ميكروسكوپ از طريق خاموش نگه داشتن مولکول بین حالت فلورسنت و غير فلورسنت محدوديت پراش را مي شكند. لازم است قبل از معرفی این روش میکروسکوپی تابع نقطه گستر توضيح داده شود. اگر يک ذره با اندازهاي كوچكتر از حد تفكيك ميكروسكوپ بهعنوان مثال یک پرتو فلورسنت با قطر ۲۰۰ نانومتر در نظر گرفته شود، هنگام تهیه تصویر از این ذره، ابتدا آن را با نور برانگیخته کرده و سپس با استفاده از یک لنز فوتونها به دوربين هدايت مي شود. اين پرتو فلورسنت به عنوان نقطه منبع برای فوتونها در نظر گرفته میشود. در حالت ایدهآل تصویر ایجاد شده باید بهصورت یک نقطه (فقط یک نقطه) به عنوان ذره (bead) دیده شود. اما در عمل تعدادی از فوتونها پراکنده شده و آنچه در تصویر دیده می شود، به صورت اسمیر (هاله) در اطراف مكان مربوط به پرتو فلورسنت متمركز شده ظاهر می شود. این اسمیر یا بهعبارتی پاسخ میکروسکوپ به نقطه منبع فوتونها تابع نقطه گستر نامیده می شود. در واقع عمل تابع نقطه گستر باعث محدود کردن وضوح میشود. به این صورت که در دیگر، اگر مولکولها در نقطه کوچکی از نمونه در حالت روشن (on) باشد و یک پرتو دونات شکل (شیرینی حلقهای) حوالی این نقطه در حالت خاموش (off) باشد، نقطه موثری که از آن پرتو فلورسنت بازتابیده میشود، بسیار کوچکتر میشود. در حقیقت با استفاده از این میکروسکوپها دستیابی به قدرت تفکیک در مقیاس دهها نانومتر امکانپذیر شده است. اگر در این روش از پروتئینها یا رنگهای قابل کلید زدنی با نور (Photoswitchable) استفاده شود، به قدرت تفکیک بیشتری نیاز نیست.

تئوری این روش میکروسکوپی به این صورت است که فرآیند برگشت به حالت پایه (De-excitation) به واسطه نشر تحریک شده بدست میآید (۸). زمانی که مولکول فلورفور در حالت برانگیخته با یک فوتون که انرژی متناسبی با آن دارد، برخورد میکند، این مولکول برانگیخته انرژی خود را از دست داده و از طریق نشر تحریک شده (قبل از اینکه نشر فلورسنس به طور خودبه خود اتفاق بیافتد)، به حالت پایه برمی گردد (۹).

نظر بگیرید دو ذره نزدیک به هم (در فاصله کمتر از نصف طول موج) پس از ترکیب شدن تابع نقطه گستر آنها، در تصویر تولید شده ایجاد اسمیر کرده و به صورت یک ذره ظاهر می شود (۷). به عبارت دیگر دو فلوروفور يكسان كه توسط يك فاصله كمتر از عرض تابع نقطه گستر جدا شدهاند، تصویر امتزاج یافتهای تولید خواهند کرد که آنالیز آن دشوار یا حتی غیر ممكن است. بنابراين وضوح نهايي ميكروسكوپ، توسط عرض تابع نقطه گستر محدود می شود. در میکروسکوپ نوری STED فلورفورها به وسیله پرتو لیزری متداول (لیزر برانگیزنده) برانگیخته شده و به دنبال آن توسط ليزر تخليه ثانويه (STED laser) با یک الگوی پرتو دونات شکل (حلقهای) متاثر می شوند (شکل ۱). در این تکنولوژی لیزر STED برعکس ليزر اول عمل مي كند و مولكول هاي برانگيخته اطراف نقطه کانونی را به حالت غیر برانگیخته برگردانده و بدین طریق فقط پرتو فلورسنسی که از مولکولهای قرار گرفته در ناحیه مرکزی زیر محدوده پراش ساطع می شوند، در ایجاد تصویر شرکت میکنند. به عبارت



"دیناری و تمجید، آخرین دستاوردها در ارتقاء وضوح میکروسکوپ نوری... "

شکل ۱- الف) طرحواره چگونگی عملکرد میکروسکوپ STED. مقایسه تصویر میکروتوبولهای کلیه جنین انسان که با رنگ MR 121 SE نشاندار شده است با میکروسکوپ کانفوکال (a) و میکروسکوپ STED. استخراج شده از منبع (۱۰).

زمان تاخیر را به دقت انتخاب شود (۱۱). به عنوان مثال طول موج پرتو STED باید نسبت به پرتو برانگیزنده بلندتر باشد تا از برانگیزش مجدد توسط پرتو STED اجتناب شود. امروزه میکروسکوپ STED دو رنگ از طریق رهیافت متکی بر لیزرهای جداگانه برای هر فلورفور یا پروتئینهای فلورسنت قابل کلیدزنی با نور طراحی شده است (۱۶–۱۲). این میکروسکوپ به طور موفقیت آمیزی برای تصویربرداری اتصالات فاصله (Gap junctions) و پرتئین ویمنتین (۱۵) و همین طور اکتین و همزمان مولکولهای پوشیده شده به وسیله لیزر دوم از حالت برانگیخته به حالت پایه برمی گردد، در حالی که مرکز آن هنوز به صورت خودبه خودی تشعشعات فلورسنت دارند. در این حالت تابع نقطه گستر به اندازه کافی کوچک بوده و طول موجهای دیگر فلورسنس و پرتوهایی که برای آشکارسازی محدودیت ایجاد میکنند، مورد استفاده قرار نمی گیرند. بنابراین تصاویر ایجاد شده با وضوح بسیار بالا قابل دستیابی هستند. در انتخاب لیزر تخلیه ضروری است پارامترهایی مثل طول موج، شدت، و

وزیکولهای سیناپسی در مشاهدات سلولهای زنده (۱٦) بهکار رفته است. وضوح اولین تصاویر گرفته شده با این میکروسکوپ در سلولهای زنده ۸۸ نانومتر بوده است (۱۷).

ب- تكنولوژى RESOLFT

به دلیل نیمه عمر فلورسنس کوتاه (کمتر از ۵ نانوثانیه) و شدت خیلی بالای (بیشتر از ۱۰۰ طول موج /سانتی متر مربع) اغلب فلورفورها برای تصویربرداری با وضوح بسيار بالا توسط روش ميكروسكوپي STED به لیزر تخلیه نیاز است (۹) (٤, ۱۸). با این وجود این ليزر با شدت بالا سبب بي رنگ شدن فلورفورها و يا آسیب به نمونههای بیولوژیکی میشود. از نظر تئوری چنانچه فلورفورها بتوانند از حالت پایای (-Long lived state) خود سوئيچ شوند، انرژي مورد نياز برای ایجاد پرتو دونات شکل بهطور معنی داری کاهش مىيابد. اين ايده اصلى ميكروسكوپ RESOLFT بود (۱۹) که در آن از سوئیچ شدن بین حالات فلورسنت کم ثبات و تاریک مربوط به فلورفورها به جای نشر تحريک شده (گسيل القايي) استفاده مي شود. تاکنون تعداد محدودی از انواع نشانگرهای (probe) قابل سوئیچ مقاوم به فرسایش (۲۰) که بتواند چندین مرتبه بین حالات تاریک و فلورسنت سوئیچ شود، گزارش شده است (۲۱). این امر یکی از موانع توسعه کاربرد RESOLFT در تصاویر مربوط به زیست شناسی است. در سال ۲۰۱۱ نوع جدیدی از پروتئین فلورسنت زرد رنگ (YFP) به نام Dreiklang معرفی شد که به وسیلهی یک ساز و کار کلیدزنی نوری جدید عمل میکند. مشابه با دیگر YFPها، پروتئین Dreiklang در ۵۳۰ نانومتر فلورسنت نشر می کند در

حالی که برانگیختگی آن در ۵۱۵ نانومتر میباشد. ویژگی متمایز کننده این پروتئین از دیگر پروتئینها این است که در ۳۴۵ نانومتر روشن (برخلاف طول موجهای رایج در تصویربرداری با پروتئینهای فلورسنت) و در ۴۰۵ نانومتر خاموش می شود. تصاویر به دست آمده با فلورسنت ناشی از پروتئین Dreiklang در مد میکروسکوپی RESOLFT با وضوحی در ابعاد کوچکتر از ۳۵ نانومتر تهیه شده که در مقایسه با تصاویر بدست آمده از روشهای دیگر جزیئات بیشتری به همراه داشت (۲۲). شایان ذکر است که ابعاد ربیوزوم انسان به عنوان بیونانوماشین زیستی ۳۵ نانومتر، آنتیبادیها ۱۲ نانومتر، tRNA حدود ۷ نانومتر، هموگلوبین ۴٫۵ نانومتر و بسیاری از پروتئین های دیگر حدود ۲٫۵ نانومتر است. بنابراین تصاویر بدست آمده از این روشهای میکروسکویی، بهمنظور بررسی ساختار و عملکرد مولکولهای زيستى فوقالذكر مفيد و كارآمد خواهند بود. پژوهشهای بعدی، به معرفی پروتئین فلورسنت دیگری منجر شد که اصطلاحا آن را پروتئین فلورسنت سبز قابل سوئيچ برگشتپذير (rsEGFP) نامیدهاند که به بیرنگ شدن در اثر برخورد نور شدید مقاوم بوده و به طور چشم گیری قادر است تا بیش از ۱۰۰۰ چرخه قابل سوئیچ شدن خود را حفظ نماید. توزيع پروتئينهاي فلورسنت سبز قابل كليدزني برگشت پذیر امتزاج یافته با پروتئینهای موجود در رده سلولی پستانداران و باکتریها، تصاویری با وضوحی در ابعاد کوچکتر از ۴۰ نانومتر ایجاد نمودهاند. در واقع فن آوری RESOLFT اصول به کار رفته در میکروسکوپ STED و میکروسکوپ GSD را با هم ادغام کرده است. در میکروسکوپ GSD نیز

ميكروسكوپ فلورسنت ميدان گسترده سود ميبرد. این پدیده سبب میشود به اطلاعات با وضوح بسیار بالا که به طور معمول در تصویر قابل مشاهده نیست، دسترسی حاصل شود. تصویر گزارش شده در یک روند غیرخطی اطلاعات جدید استخراج و در تهیه تصویر بازسازی شده با وضوح عالی به کار برده می شود. مفهوم به کار رفته در روش میکروسکوپی نورتابی ساختار یافته به آسانی از طریق اثر مویر قابل درک است. اگر دو الگوی معین بر هم منطبق باشند-یک الگوی ضربان- حاشیه مویر در محصول برآیند ظاهر خواهد شد (۳). در میکروسکوپ SIM، نورتابی در سطح نمونه با نور الگویافته انجام شده و افزایش وضوح توسط اندازه گیری حاشیهها در الگوی مویر بدست مىآيد كه خود ناشى از تداخل الگوى نورتابشی و پراش یافته نمونه است. میکروسکوپ SIM وضوح فضایی را از طریق جمع آوری اطلاعات از فضاهای بیرونی ناحیه قابل مشاهده، افزایش میدهد. این فرآیند در یک فضای متقابل (دو جانبه) انجام میشود. انجام معادلات فوریه ترانسفرم مربوط به تصویر بدست آمده از SIM حاوی اطلاعات اضافی از نواحی مختلف فضای متقابل هست. در روش میکروسکوپی SIM (شکل ۲) از دو رویکرد شامل پروتکل های اختصاصی و نرمافزارهای آنالیز کننده استفاده می شود. از نشانگرهای فلورسنت استفاده می شود. در شرایط استاندارد یک نشانگر قادر است آزادانه از حالت پایه برانگیخته شده و به صورت خود به خودی با نشر فوتون فلورسنت به حالت پایه برگشت کند. با این وجود اگر نور با طول موج مناسب به صورت اضافی اعمال شود مولکول رنگی می تواند به حالت طولانی عمر تاریک یعنی حالتی که فلورسانس رخ نمی دهد، (حالت ۳ گانه = Triplet-state) برانگیخته شود. تا زمانی که مولکول در حالت طولانی عمر قرار بگیرد، نمی تواند از حالت پایه برانگیخته شود. سویچینگ بین نمی تواند از حالت پایه برانگیخته شود. سویچینگ بین نما پیش فرض های لازم برای مفهوم RESOLFT را برآورده می کند و تصویربرداری زیر محدوده پراش و وضوح بسیار بالا را مهیا می کند.

ج- میکروسکوپ SSIM

در سال ۱۹۹۰ برای ارتقاء وضوح جانبی میکروسکوپ میدان دور از تکنیک تداخلی (Interferometric) در روش میکروسکوپی که اصطلاحا آن را میکروسکوپ نور ساختار یافته مینامیدند، استفاده شد. در روش میکروسکوپی SIM یک وضوح گسترش یافته از طریق اثر مویر که از الگوی فرکانس فضایی سود می برد، بدست می آید. در واقع شکسته شدن محدودیت وضوح جانبی که به واسطه قانون فاکتور دو (Factor of tow) به دست می آید از روشنایی ساختار یافته فضایی در



شکل ۲– الف) استفاده از تکنیک تداخلی (interferometric) و اثر moir'e در روش میکروسکوپی SSIM. ب) تصویربرداری با وضوح بسیار بالا از کروماتین هسته در مرحله پرومتافاز سلولهای C2C12 : تصویر سمت چپ توسط میکروسکوپ نوری میدان دور و تصویر سمت راست توسط میکروسکوپ 3D-SIM تهیه شده است. استخراج شده از منبع (۲۳).

برچسب دار ایجاد کرده است. امروزه با استفاده از این روش میکروسکوپی توانستهاند تصاویر با وضوح عالی از هسته و فرآیند تقسیم هسته تهیه کنند. تصویر برداری با وضوح بسیار بالا مبتنی بر مکانیابی تک مولکول (مولکول منفرد) بر پایه نشانگرهای قابل فعال شدن با نور هست که توسط لیزری با طول موج شدن با نور هست که توسط لیزری با طول موج برانگیخته میشود. در این روش تصویربرداری برای فعالسازی تصادفی نشانگرهای قابل فعال شدن با نور (شکل ۳) در هر مرحله تعداد کمی از مولکولها در هر شات (عکس) تصویربرداری برانگیخته شده و مرکز هر مولکول فلورسنت مستقل با استفاده از تابع گوسین مکانیابی میشود (۲٤). در SSIM فلورفور از حالت برانگیخته به حالت پایه خالی میشود. این عمل از طریق نور تحریکی اشباع شده انجام شده و یک الگوی نشری سینوسی را ایجاد میکند که بر روی آشکارگر ثبت میشود. در نتیجهی اثر غیرخطی، وضوح مناسبی بدست آمده و در ادامه تصویر با وضوح بسیار بالا بازسازی میشود. اگر چه از لحاظ تئوری وضوح MSS نامحدود است، اما اثر فلورسنس غیرخطی با فرونشانیهای شدید، بیرنگ شدن و پدیده اشباع شدن همراه است که کاربرد آن را در نمونههای زیستی به شدت محدود میکند. اخیرا پروتئین موسر که یک پروتئین فلورسنت قابل سوئیچ با نور هست، معرفی شده که وضوحی برابر ۴۰ نانومتر را روی میکروتوبولهای خالصسازی شده



شکل ۳- الف) طرحواره چگونگی عملکرد مکانیابی تک مولکولهای فلورسنت. ب) تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ STORM از سانتریولهای سلولهای 2₂ رنگآمیزی شده با آنتیبادی MD و آنتیبادی ثانویه ANTI-RABBIT ترکیب شده با رنگ آلی ALEXA 647/ALEXA 405. استخراج شده از منبع (۲۵)

> تصویربرداری با وضوح بسیار بالا با دقتی برابر با دهها نانومتر از طریق ترکیب کردن صدها تا دهها هزار از فریمهای خام که هر یک حاوی فقط تعداد کمی مولکول منفرد هست بازسازی می گردد. مکانیابی این تک مولکولهای مستقل با دقت زیاد برای بدست آوردن تصاویر با وضوح بسیار بالا مهم و حیاتی است. تخمین دقت مکانیابی با تعداد فوتونها این فرصت را برای میکروسکوپ با وضوح عالی، فراهم میکند که محدودیت ناشی از پراش نور را مرتفع کند. از این رو مسئله مهم دیگر که باید مد نظر قرار گیرد، شدن با نور است که در تصویربرداری با وضوح عالی شدن با نور است که در تصویربرداری با وضوح عالی مبتنی بر مکانیابی تک مولکول مورد استفاده قرار می گیرد. تعدادی زیادی از فلورفورهای قابل فعال

پروتئینهای فلورسنت برای توسعه تصویر برداری با وضوح بالا ارائه شدهاند (۲٦, ۲۷). بهطور معمول در هر مرحله سوئیچ شدن این نشانگرها در حضور هزار فوتون عملکرد داشته و وضوح را تا ابعاد کمتر از ۲۰ الی ۱۰ نانومتر ارتقاء داده است.

الف– ميكروسكوپ STORM

فن آوری STORM در سال ۲۰۰۴ توسعه یافته است (۲۸) که در آن تصویر نهایی از بازسازی تصاویر مربوط به مکانیابی مولکولهای فلورسنت مستقلی که با استفاده از نور رنگهای مختلف روشن و خاموش میشود بدست میآید. میکروسکوپ STORM میتواند با دامنهای از نشانگرهای قابل سوئیچ با نور شامل رنگها و پروتئینهای فلورسنت (۲۹) به کار برده شود. در این روش میکروسکوپی از رنگهای سیانین،

"مجله ایمنی زیستی، دوره ۱۰، شماره ۲، تابستان ۹۴

ب- میکروسکوپ PALM

درک این نکته که مولکولهایی که در ساختار خود حاوی عوامل برچسبدار به عنوان یک منبع نوری نانومقیاس هستند، نکتهای کلیدی و ارزشمند است. برای غلبه بر محدودیت ناشی از پراش در روشهای میکروسکوپی باید فلورسانس مربوط به مولکولهای قرار گرفته در نزدیکی ناحیه محدود کننده پراش در نمونه را از نظر خاموشی و روشنی تغییر داده و میزان نشر را در سطح خیلی پائین نگه داشته و در ادامه در غالب یک الگوی زمانی پیوسته (شیوه زمانهای متوالی) تک مولکولهای موجود در نمونه را به صورت تصادفی روشن و خاموش و مکانیابی کرد. بنابراین با گزارش کردن موقعیت مولکولهای منفرد (تک مولکول) با اندازه ۱ تا ۲ نانومتر (اندازه) به عنوان نشر كننده فلورنست با دقت فضايي بالا (١٠ تا ۴۰ نانومتر) نمونه مربوطه را تعین هویت کرد (۳۷، ۳۹). مطالعات نشان داده مشکل تصویربرداری معمولی در میکروسکوپ فلورسنت میدان دور این است که همه مولکولها در یک آرایش فضایی معین به طور همزمان برانگیخته شده و فلورسنس میشوند. این باعث میشود پراش نور مولکولهای برانگیخته در تصویر ایجاد شده با هم همپوشانی داشته و باعث تداخل در تصویر و کاهش وضوح تصویر شود. از این رو توزیع مولکولهای منفرد به صورت مجموعه هايي پراكنده (از نظر فضايي فواصل پراکندگی آنها بیشتر از ابعاد ایجاد کننده پراش باشد) رنگهای چشمک زن استفاده می شود (۲, ۵, ۳۰ و ۳۲). اخیرا پژوهشگران خصوصیات سوئیچ شدن ۲٦ رنگ آلی و همین طور خصوصیاتی که به طور مستقیم با كيفيت تصوير با وضوح عالى مرتبط هستند کمیسازی نمودهاند. علاوه بر رنگهای آلی ذکر شده از پروتئینهای فلورسنت سوئیچ شونده با نور مانند mEos2 و ژن مربوط به پروتئینهای فلورسنت (-PA GFP) در تصویربرداری روش میکروسکوپی STORM استفاده شده است (۳۵–۳۳). نکتهای که بیان آن لازم است این که زمانی که نشانگرهای فلورسنت برای روش میکروسکوپی STORM انتخاب مى شوند، خصوصيات آن ها شامل فوتون هاى لازم برای هر سوئیچ شدن، بازده چرخههای خاموش و روشن شدن، پایداری در برابر نور و تعداد چرخههای سوئیچ شدن مد نظر قرار میگیرد (۳٦). یکی از مزایای تصویربرداری با وضوح عالی، در روش میکروسکوپی STORM، تهیه تصویر از برهمکنشهای مولکولی با دقت خیلی زیاد است. انواعی از ترکیبات رنگی قابل سوئیچ با نور و همین طور پروتئین های فلورسنت ذکر شده در متن بالا برای تصویربرداری چند رنگ با وضوح بسیار بالا استفاده شده است (۲۹). تصویربرداری سه بعدی با وضوح بسیار بالا و همین طور تهیه تصویر از سلولهای زنده موضوعات مهمی برای میکروسکوپ STORM هستند. با این روش میکروسکوپی تصاویری سه بعدی و سریع از سلولهای زنده تهیه شده است که تفکیک کلی برابر با ۳۰ نانومتر در جهت x و x ، ۹۰ نانومتر در جهت z ، و وضوح زمانی (Time Resolutions) با سرعتی برابر ۱ تا ۲ ثانیه داشت .(٣٦)

تعدادی فوتون در یک الگوی انفجار فوتونی قبل از برگشت به حالت غیر فلورسنت باعث آشکار شدن موقعیت خودشان می شوند و بنابراین مولکول های اطراف موجود در ساختار را وادار میکنند تا به حالت سیگنالدهی وارد شده و موقعیت خود را در ترکیب نمونهی مورد مطالعه نشان دهند. همان گونه که در بالا ذکر شد، اولین گزارشات تصویربرداری با وضوح بسیار بالا با استفاده از مکانیابی تک مولکولها در روش میکروسکویی STORM و یا PALM بدست آمد. اگر چه در نمونههای با ساختار ایستا، اکتساب زمان اهمیت کمتری دارد، برای نمونههای پویا باید دوره زمانی مربوط به بازآرایی ساختار لحاظ شود و بنابراین نقش بسیار مهم زمان جلوهگر می شود. یک راهحل این است که از طریق افزایش سرعت سوئیچ شدن در این روش موقعیتهای بیشتری را در دورههای زمانی کوتاهتری گزارش کرد. در واقع چندین گروه مولکولی قابل سوئیچ به کار میرود تا بازه زمانی را در دامنه بین ۱ تا ۱۰ ثانیه کاهش دهد.

باعث می شود که مولکوهای نشانگر در حالت روشن بتواند نشر نور داشته در حالی که بقیه هنوز تاریک باقی مانده و موقعیت آنها در یک الگوی زمانی متوالى استخراج شود. اين روش از طريق يافتن مراكز مربوط به هر تک مولکول و در ادامه بازسازی تصویر به واسطه خودآرایی مجموعهای از موقعیتهای تخمين زده انجام ميشود. توانايي تعيين موقعيت هر مولکول منفرد (شکل ٤)، فرآیندی است که در اصطلاح به این مکانیابی Super-localization می گویند (۲٤, ٤٠ و ٤٣). برای تصاویری که با هم تداخل نمی کنند و بنابراین به طور مستقل قابل شناساییاند یک ساز و کار به صورت کنترل فعال (Active control) لازم است، يعنى جايىكه محقق بتواند بین تعداد انبوهی از مولکولهای خاموش (تاریک) و کسر خیلی کوچک فلورسنت تعادل برقرار کند. بدینصورت که در هر زمان کسر کوچکی از مولکولها روشن و قسمت اعظم أنها به صورت خاموش باقی بماند. مولکولهای منفرد از طریق نشر

"مجله ایمنی زیستی، دوره ۱۰، شماره ۲، تابستان ۹۴



شکل ٤- الف) الگوی پیدا کردن مرکز مربوط به هر تک مولکول و بازسازی از طریق خودآرایی لیستی از موقعیتهای تخمین زده شده. ب) تصویربرداری با میکروسکوپ PALM بر روی سلول زنده. این تصویر مربوط به امتزاج بین پروتئین PAXILLIN (یک گیرنده فرآیند انتقال سیگنال در سلول) با EOSFP (یک پروتئین نشانگر فلورسنت) است. ج) بزرگنمایی از ناحیه سبز رنگ موجود در تصویر ب (شروع چسبندگی کمپلکس) برای مدت زمان ۲۳ دقیقه. مقیاس مورد استفاده ۳ میکرومتر است. استخراج شده از منبع (٤٤).

میکروسکوپ PALM در سال ۲۰۰۶ (۲) بر پایه فعالسازی تصادفی، مکانیابی و بلیچشدن پروتئینهای فلورسنت منفرد قابل فعالسازی/ شدن با نور ابداع شد. در این میکروسکوپ به طور ویژه تعدادی از پروتئینهای فلورسنت با نوری که شدت پائینی از پالسهای لیزری (٤٥٠ نانومتر) دارد فعال شده و در ادامه مولکولهای فعال شده با طول موج

تحریک می شدند. در هر مرحله فقط کسر کوچکی از مولکول های فلورسنت فعال بوده و مابقی پروتئین های فلورسنت خاموش شده و در چرخه بعدی شرکت نمی کنند. در واقع هنگامی که لیزر **۱۰۵** نانومتر برای یک دوره طولانی مدت به سطح نمونه تابیده شود، باعث می شود مولکول های برانگیخته به صورت دائمی بلیچ شده و بدین طریق در چرخه بعدی شرکت نکنند. پس از تکرار شدن این چرخه فعال سازی

تصادفی برای چندین مرتبه تصویر نهایی با وضوح بسیار بالا بدست می آید. در ادامه از طریق محاسبه و ثبت موقعیت مراکز مولکول های برانگیخته شده مکان دقیق آن ها بدست می آید.

۳- تصویر برداری بر پایه بیرنگ شدن (بلیچ شدن) و چشمک زدن نشانگرهای فلورسنت

ویژگیهای رفتاری از قبیل بیرنگ شدن و چشمک زدن از خصوصیات ذاتی اغلب نشانگرهای فلورسنت است (۴۵). بر این اساس در سال ۲۰۰۴ دو روش تصویربرداری ابداع شد. این روشها شامل تصویر برداری با وضوح عالی از طریق بلیچ شدن نوری و همچنین مکانیابی نانومتری به واسطهی تک مولکولهای چندگانه (NALMS) است که دقت مکانیابی آن تا ابعاد ^۵ نانومتری ذکر شده است (۴۴).

یکی از امتیازات روش میکروسکوپی BaLM در قیاس با روشهای PALM/STORM این است که بر خلاف روش تصویربرداری PALM/STORM یه رنگهای آلی سوئیچ شونده و پروتئینهای قابل فعال شدن با نور که از لحاظ تکنیکی با چالشهایی روبرو رفتاری بلیچ شدن و چشمک زدن نشانگرهای فلورسنت است (۸۸). به این ترتیب در این روش مجموعهای از تصاویر فلورسنس بدست آمده و وقایع بلیچ شدن و چشمک زنی توسط کاستن متعاقب فلورسنس تصاویر، سیگنالهای نشری فلورسنس از فلورفورهای منفرد تعیین هویت شده و با دقتی در حد مالورفورهای منفرد تعیین هویت شده و با دقتی در حد

روش SOFI نوع دیگری از تصویربرداری با وضوح بسیار بالا –مشابه با روش میکروسکوپی BaLM است که در آن تفکیک فضایی (Spatial resolution) از طریق نوسانات نوری به میزان ٥ برابر ارتقاء یافته است (٤٩). در تکنیک SOFI از رنگهای آلی و نقاط کوانتومی به عنوان مولکولهای گزارشگر استفاده شده است. در مقایسه با دیگر الگوریتمهای تصویربرداری، روش SOFI توانسته است بهعنوان یک رویکرد جذاب برای تصویربرداری ۳ بعدی با سرعت بالا از نمونههای زیستی مورد استفاده قرار گیرد (۵۰). دانشمندان طی تحقیقات، تصاویری با وضوحی در حد •• نانومتر از یک سلول کامل در کسر زمانی ٤ ثانیه بدست آوردهاند (٥١). انواعی از روشهای دیگر مبتنی بر روش استاندارد SOFI ابداع شده و برای بررسی وقایع پویای درون سلول با وضوح زمانی دلخواه در تصاویر به دست آمده استفاده میشود .(07)

استفاده از تصویربرداری با وضوح بسیار زیاد در زیست شناسی سلولی و مولکولی

زیست شناسان از تکنیکهای تصویربرداری مبتنی بر فلورسنس با وضوح بسیار بالا در انواعی از زمینههای تحقیقاتی از قبیل سازههای سلولی، سازماندهی انواع مولکولهای نامتجانس، سازماندهی پویایی سیناپسهای عصبی استفاده میکنند. ویژگی مشترک همه این حوزهها این است که آنها درگیر در برآیند کلی ناشی از برهمکنش اجزا در شکلگیری خصوصیات در مقیاس سلولی هستند. بنابراین تصاویر بدست آمده حاوی اطلاعات اختصاصی از اجزاء سلولی در مقیاس نانومتری هستند که می تواند منجربه

شمارش لازم است (۷۰). چالش دیگر در تصویربرداری با وضوح بسیار بالا محدودیت تفکیک زمانی آن است. مقیاس زمانی برای تصاویر با وضوح بسیار بالا به طور معمول در بازه زمانی چند ثانیه تا چند دقیقه است. بهعنوان مثال به دست آوردن تفکیک فضایی در ۵۰ تا ۷۰ نانومتری در STORM بهطور معمول چندین هزار فریم و یا دهها ثانیه نیاز دارد (۷۱). این در حالی است که این مقیاس زمانی برای بسیاری از وقایع پویا و ویژگیهای ساختاری طولانی بوده و برای بدست آوردن سیگنالهای اطلاعاتی معنىدار كارآمد نيست. بنابراين روش،هاى تصویربرداری سریعتر به طور قطع مناسبتر هستند. اصولا روش های تصویربرداری مبتنی بر مکانیابی تک مولكول از قبيل STORM و PALM بر پايه تصويربرداري قابل تكرار و مكانيابي زير مجموعه های پراکنده مولکول های فعال می باشد. برای رسیدن به استاندارد نایکوئیست (واحد استاندارد در تاييد اين كه نقاط مجاور كه مكانيابي شدهاند، از حد تفکیک فضایی به هم نزدیکتر هستند)، وقایع فعال سازی تک مولکول باید هزاران بار ذخیره شود تا اطمينان حاصل شود نقاط مجاور مكانيابي شده يك برابر از تفکیک فضایی مورد نظر نزدیکتر شده و در نتيجه وضوح زماني را تا حدود زيادي محدود ميكند .(٧٢)

شدت برانگیختی بالاتر میتواند سرعت سوئیچ شدن را افزایش دهد و در نتیجه باعث بهبود یافتن وضوح زمانی شود اما از طرفی سبب آسیب نوری شود (۷۳). علاوه براین در مورد پروتئینهای فلورسنت سریع شدن نرخ سوئیچ شدن میتواند سبب تخریب سیگنال شود. یک رویکرد جایگزین افزایش تراکم یک نگرش بنیادی جدید در این زمینه باشد. کاربرد آنها در میکروبیولوژی (۵۳)، عصب شناسی (۵۶, ۵۵) همین طور دیگر زمینه های پزشکی بسیار زیاد و قابل ملاحظه است. با استفاده از تکنولوژی تصویربرداری با وضوح بسیار بالا اطلاعات و یافته های ارزشمندی در حوزه هایی مانند بررسی کرموزوم ها (۵۲, ۸۵)، نقشه یابی ژنوم (۹۹, ۲۰)، انتقالات غشایی (۵, ۲۱, ۲۲)، آلودگی های ویروسی (۳۳, ۵۰) و تقسیم سلولی (۲۲, ۲۷) بدست آمده است. با این فن آوری می توان چگونگی برهمکنش پروتئین ها را مشاهده کرد و یا به مطالعه چگونگی نتقال پروتئین ها به بخش های خاصی از سلول و ضرورت وجود آن ها در این بخش ها پرداخت.

چالشرهای مرتبط با تصویر برداری با وضوح بسیار بالا

یکی از چالش های تصویربرداری با وضوح بسیار بالا از نمونه های زیستی و غیرزیستی، مشکلات تکنیکی است که در این بخش به برخی از آن ها اشاره می شود. به طور کلی دو منبع اصلی برای ایجاد خطا در این روش های تصویربرداری وجود دارد. منبع اول که به طور معمول در تصویربرداری نقش دارد، شامل چشمک زدن ذاتی مولکول نشانگر است که منجر به خطای شمارش بیش از حد می شود. این در حالی است که فعال سازی غیر قابل اجتناب چند مولکول به طور همزمان در یک ناحیه محدودیت پراش، باعث پنهان ماندن مولکول ها و شمارش تعداد کمتری از آن-ها می شود (۲۸, ۲۹). بنابراین یک الگوی اختصاصی از فعال سازی و مدل سازی دقیق برای تعادل بین

فلورفورهای فعال شده است، بهطوری که هر فریم دوربین مولکولهای بیشتری را در نمونه ذخیره کند. با این وجود این تراکم بالای لکههای فلورسنت سبب همپوشانی سیگنالها شده و بنابراین الگوریتمهای مکانیابی کلاسیک نمیتواند کارآمد بوده و مورد استفاده قرار گیرد. الگوریتمهای مکانیابی جدید سرعت تصویربرداری را بهبود بخشیده و به دنبال آن وضوح زمانی ۳ ثانیه مبتنی بر تکنولوژی بازیافت سیگنالهای پراکنده و ضعیف را سبب شود (۷۶, ۷۵).

با توجه به خودآرایی ۳ بعدی سازههای زیستی، چالش دیگر تصویربرداری فلورسنت با وضوح بسیار بالا تهیه تصاویر ۳ بعدی با وضوح نانومتری در همه ابعاد است. ساده ترین راه برای ایجاد تصاویر ۳ بعدی با وضوح بسیار زیاد تهیه یک ردیف برشهای مکانیکی از بافت در ترکیب با تکنیکهای استاندارد است. در سال ۲۰۰۸ با استفاده از این استراتژی، بازسازی تصویر ۳ بعدی حاصل از روش STED، با وضوحی کمتر از ۸۰ نانومتر در همه جهات بدست آمد (۷٦). در تکنیکهای پیشرفتهتر در روش میکروسکوپی STED وضوحی برابر با ۳۰ نانومتر را ایجاد کردند (۷۷). یکی دیگر از راهکارهای بهبود روشهای تصویربرداری با وضوح بسیار زیاد استفاده از نشانگرهای فلورسنتی با طول عمر بیشتر و درخشان تر است. برای افزایش نشر از برچسبهای برانگیخته شده چندین مسیر شامل مهندسی کردن پروتئین های فلورسنت (۷۸)، بهبود یافتن تکنیک ها برای افزایش اختصاصیت، برچسب گذاری اهداف

داخل سلولی با فلورفورهای آلی (۷۹) و توسعه روشها مد نظر قرار گرفته است.

نتيجهگيري

با بهبود یافتن روشها و در دسترس بودن میکروسکوپ فلورسنت با تصویربرداری با وضوح بسیار بالا، کاربرد این تکنولوژی قدرتمند در دامنهی وسيعى از تحقيقات زيست شناسي مي تواند مورد استفاده قرار گرفته و منشاء نگرشی جدید در حیات موجودات زنده باشد. ارتقاء روشهای تصویربرداری با وضوح بسیار زیاد در میکروسکوپ نوری شکاف بین قدرت تفکیک آنها را در تقابل با روشهای مبتنی بر میکروسکوپ الکترونی از بین برده است. امروزه این روشهای میکروسکوپی که مبتنی بر توالی پیوستهای از مکانیابی تک مولکول های مستقل است توسعه یافته و تبدیل به یک ابزار ۳ بعدی منحصر به فرد برای مطالعه دنیای پویای سلولی شده و کلیدی برای اختصاصیت بالاتر مولکولی و حداقل نگه داشتن حالت تهاجمی برای بافتهای موجودات زنده است. با بهره گیری از این تکنولوژی جدید چگونگی برهمکنش پروتئینها با یکدیگر، نحوه انتقال پروتئینها به بخشهای خاصی از سلول و ضرورت حضور آنها در بخشهای مختلف سلول، قابل مشاهده و مطالعه خواهد بود. به اینترتیب به کارگیری این روشها برای درک این ساز و کارها و ابداع روشهای درمانی جدید در تمام حوزههای پژوهشی نانوزیست فناوری بسیار ضروری و راەگشاست.

References

- 1- Hao X, Kuang C, Gu Z, Wang Y, Li S, Ku Y, Li Y, Ge J, Liu X. 2013. From microscopy to nanoscopy via visible light. Light: Science & Applications 2:e108.
- 2- Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF. 2006. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. Science 313:1642-1645.
- 3- Gustafsson MG. 2000. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. J. Microsc. 198:82-87.
- 4- Hell SW, Wichmann J. 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. Opt. Lett. 19:780-782.
- 5- Bates M, Huang B, Dempsey GT, Zhuang X. 2007. Multicolor super-resolution imaging with photoswitchable fluorescent probes. Science 317:1749-1753.
- 6- Heintzmann R, Jovin TM, Cremer C. 2002. Saturated patterned excitation microscopy—a concept for optical resolution improvement. JOSA A 19:1599-1609.
- 7- valen dv. 2009 .point spread function workshop.
- 8- Rittweger E, Rankin B, Westphal V, Hell S. 2007. Fluorescence depletion mechanisms in superresolving STED microscopy. Chem. Phys. Lett. 442:483-487.
- Huang B, Bates M, Zhuang X. 2009. Super resolution fluorescence microscopy. Annu. Rev. Biochem. 78:993.
- Dyba M, Jakobs S, Hell SW. 2003. Immunofluorescence stimulated emission depletion microscopy. Nature Biotechnology 21:1303-1304.
- Pohl DW, Denk W, Lanz M. 1984. Optical stethoscopy: Image recording with resolution λ/20. Appl. Phys. Lett. 44:651-653.
- 12- Donnert G, Keller J, Wurm CA, Rizzoli SO, Westphal V, Schönle A, Jahn R, Jakobs S, Eggeling C, Hell SW. 2007. Two-color far-field fluorescence nanoscopy. Biophys. J. 92:L67-L69.
- 13- Meyer L, Wildanger D, Medda R ,Punge A, Rizzoli SO, Donnert G, Hell SW. 2008. Dual-Color STED Microscopy at 30-nm Focal-Plane Resolution. Small 4:1095-1100.
- 14- Willig KI, Stiel AC, Brakemann T, Jakobs S, Hell SW. 2011. Dual-label STED nanoscopy of living cells using photochromism. Nano Lett.s 11:3970-3973.
- 15- Hein B, Willig KI, Wurm CA, Westphal V, Jakobs S, Hell SW. 2010. Stimulated emission depletion nanoscopy of living cells using SNAP-tag fusion proteins. Biophys. J. 98:158-163.
- 16- Westphal V, Rizzoli SO, Lauterbach MA, Kamin D, Jahn R, Hell SW. 2008. Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. Science 320:246-249.
- 17- Pellett PA, Sun X, Gould TJ, Rothman JE, Xu M-Q, Corrêa IR, Bewersdorf J. 2011. Two-color STED microscopy in living cells. Biomed .Opt. Express 2:2364-2371.
- Klar TA, Jakobs S, Dyba M, Egner A, Hell SW. 2000. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. Proceedings of the National Academy of Sciences 97:8206-8210.
- Hell SW, Dyba M ,Jakobs S. 2004. Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy. Curr. Opin. Neurobiol. 14:599-609.

- 20- Vaughan JC, Zhuang X. 2011. New fluorescent probes for super-resolution imaging. Nat. Biotechnol. 29:880-881.
- 21- Chang H, Zhang M, Ji W , Chen J, Zhang Y, Liu B, Lu J, Zhang J, Xu P, Xu T. 2012. A unique series of reversibly switchable fluorescent proteins with beneficial properties for various applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109:4455-4460.
- 22- Brakemann T, Stiel AC, Weber G ,Andresen M, Testa I, Grotjohann T, Leutenegger M, Plessmann U, Urlaub H, Eggeling C. 2011. A reversibly photoswitchable GFP-like protein with fluorescence excitation decoupled from switching. Nat. Biotechnol. 29:942-947.
- 23- Schermelleh L, Carlton PM, Haase S, Shao L, Winoto L, Kner P, Burke B, Cardoso MC, Agard DA, Gustafsson MGL, Leonhardt H, Sedat JW. 2008. Subdiffraction Multicolor Imaging of the Nuclear Periphery with 3D Structured Illumination Microscopy. Science 320:1332-1336.
- 24- Thompson RE, Larson DR, Webb WW. 2002. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. Biophysical journal 82:2775-2783.
- 25- Mennella V, Keszthelyi B, McDonald KL, Chhun B, Kan F, Rogers GC, Huang B, Agard DA. 2012. Subdiffraction-resolution fluorescence microscopy reveals a domain of the centrosome critical for pericentriolar material organization. Nature Cell Biology 14:1159-1168.
- 26- van de Linde S, Heilemann M, Sauer M. 2012. Live-cell super-resolution imaging with synthetic fluorophores .Annu. Rev. Phys. Chem.s 63:519-540.
- 27- Patterson G, Davidson M, Manley S, Lippincott-Schwartz J. 2010. Superresolution imaging using single-molecule localization. Annu. Rev. Phys. Chem. 61:345.
- 28- Rust MJ, Bates M, Zhuang X. 2006. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). Nat. Methods 3:793-796.
- 29- Bates M, Huang B, Zhuang X. 2008. Super-resolution microscopy by nanoscale localization of photo-switchable fluorescent probes. Curr. Opin. Chem. Biol. 12:505-514.
- 30- Bates M, Blosser TR, Zhuang X. 2005. Short-range spectroscopic ruler based on a single-molecule optical switch. Physical review letters 94:108101.
- 31- Heilemann M, van de Linde S, Schüttpelz M, Kasper R, Seefeldt B, Mukherjee A, Tinnefeld P, Sauer M .Υ··Λ .Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. Angewandte Chemie International Edition 47:6172-6176.
- 32- Fölling J, Belov V, Kunetsky R, Medda R, Schönle A, Egner A, Eggeling C, Bossi M, Hell SeW. 2007. Photochromic rhodamines provide nanoscopy with optical sectioning. Angew. Chem. Int. Ed. 46:6266-6270.
- 33- Wiedenmann J, Ivanchenko S, Oswald F, Schmitt F, Röcker C, Salih A, Spindler K-D, Nienhaus GU. 2004. EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.s 101:15905-15910.
- 34- Patterson GH, Lippincott-Schwartz J. 2002. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. Science 297:1873-1877.
- 35- McKinney SA, Murphy CS, Hazelwood KL, Davidson MW, Looger LL. 2009. A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. Nat. Methods 6:131-133.
- 36- Dempsey GT, Vaughan JC, Chen KH, Bates M, Zhuang X. 2011. Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. Nat. Methods 8:1027-1036.
- 37- Moerner WE. 2010. Single-molecule optical spectroscopy and imaging: from early steps to recent

advances, p. 25-60, Single Molecule Spectroscopy in Chemistry, Physics and Biology. Springer Berlin Heidelberg.

- 38- Moerner W. 2007. New directions in single-molecule imaging and analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104:12596-12602.
- 39- Hell SW. 2009. Microscopy and its focal switch. Nat. Methods 6:24-32.
- 40- Moerner W, Kador L. 1989 .Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. Phys. Rev. Lett. 62:2535.
- 41- Moerner W, Basche T. 1993. Optical spectroscopy of single impurity molecules in solids. Angew. Chem. Int. Ed. 32:457-476.
- 42- Betzig E, Chichester RJ. 1993. Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy. Science 262:1422-1425.
- 43-mBobroff N. 1986. Position measurement with a resolution and noise-limited instrument. Rev. Sci. Instrum. 57:1152-1157.
- 44- Shroff H, Galbraith CG, Galbraith JA ,Betzig E. 2008. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. Nature Methods 5:417-423.
- 45- Bopp MA, Jia Y, Li L, Cogdell RJ, Hochstrasser RM. 1997. Fluorescence and photobleaching dynamics of single light-harvesting complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94:10630-10635.
- 46- Qu X, Wu D, Mets L, Scherer NF. 2004. Nanometer-localized multiple single-molecule fluorescence microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:11298-11303.
- 47- Gordon MP, Ha T, Selvin PR. 2004 .Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:6462-6465.
- 48- Burnette DT, Sengupta P, Dai Y, Lippincott-Schwartz J, Kachar B. 2011. Bleaching/blinking assisted localization microscopy for superresolution imaging using standard fluorescent molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108:21081-21086.
- 49- Dertinger T, Colyer R, Iyer G, Weiss S, Enderlein J. 2009. Fast, background-free, 3D superresolution optical fluctuation imaging (SOFI). Proc. Natl. Acad .Sci. U. S. A. 106:22287-22292.
- Geissbuehler S, Dellagiacoma C, Lasser T. 2011. Comparison between SOFI and STORM. Biomed. Opt. Express 2:408-420.
- 51- Cox S, Rosten E, Monypenny J, Jovanovic-Talisman T, Burnette DT, Lippincott-Schwartz J, Jones GE, Heintzmann R. 2012. Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics. Nat. Methods 9:195-200.
- 52- Cho S, Jang J, Song C, Lee H, Ganesan P, Yoon T-Y, Kim MW, Choi MC, Ihee H, Do Heo W. 2013. Simple super-resolution live-cell imaging based on diffusion-assisted Forster resonance energy transfer. Sci. Rep. 3.
- 53- Coltharp C, Xiao J. 2012. Superresolution microscopy for microbiology. Cell. Microbiol. 14:1808-1818.
- 54- Sigrist SJ, Sabatini BL. 2012. Optical super-resolution microscopy in neurobiology. Curr. Opin. Neurobiol. 22:86-93.
- 55- Tønnesen J, Nägerl UV. 2013. Superresolution imaging for neuroscience. Exp. Neurol. 242:33-40.
- 56- Zessin PJ, Finan K, Heilemann M. 2012. Super-resolution fluorescence imaging of chromosomal DNA. J. Struct. Biol.s 177:344-348.

"دیناری و تمجید، آخرین دستاوردها در ارتقاء وضوح میکروسکوپ نوری...

- 57- Wang W, Li G-W, Chen C, Xie XS, Zhuang X. 2011. Chromosome organization by a nucleoidassociated protein in live bacteria. Science 333:1445-1449.
- 58- Matsuda A, Shao L, Boulanger J, Kervrann C, Carlton PM, Kner P, Agard D, Sedat JW . You Condensed mitotic chromosome structure at nanometer resolution using PALM and EGFP-histones. PloS one 5:e12768.
- 59- Baday M, Cravens A, Hastie A, Kim H, Kudeki DE, Kwok P-Y, Xiao M, Selvin PR. 2012. Multicolor super-resolution DNA imaging for genetic analysis. Nano Lett. 12:3861-3866.
- 60- Lubeck E, Cai L. 2012. Single-cell systems biology by super-resolution imaging and combinatorial labeling. Nat. Methods 9:743-748.
- 61- Wu M, Huang B, Graham M, Raimondi A, Heuser JE, Zhuang X, De Camilli P. 2010 .Coupling between clathrin-dependent endocytic budding and F-BAR-dependent tubulation in a cell-free system. Nat. Cell Biol.s 12:902-908.
- 62- Huang B, Wang W, Bates M, Zhuang X. 2008. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. Science **319**:810-813.
- 63- Chojnacki J, Staudt T, Glass B, Bingen P, Engelhardt J, Anders M, Schneider J, Müller B, Hell SW, Kräusslich H-G. 2012. Maturation-dependent HIV-1 surface protein redistribution revealed by fluorescence nanoscopy. Science 338:524-528.
- 64- Pereira CF, Rossy J, Owen DM, Mak J, Gaus K. 2012. HIV taken by STORM: super-resolution fluorescence microscopy of a viral infection. Virol. J. 9:84.
- 65- Malkusch S, Muranyi W, Müller B, Kräusslich H-G, Heilemann M. 2013. Single-molecule coordinate-based analysis of the morphology of HIV-1 assembly sites with near-molecular spatial resolution. Histochem. Cell Biol. **139**:173-179.
- 66- Lüders J. 2012. The amorphous pericentriolar cloud takes shape. Nat. Cell Biol. 14:1126-1128.
- 67- Mennella V, Keszthelyi B, McDonald K, Chhun B, Kan F, Rogers G, Huang B, Agard D. 2012. Subdiffraction-resolution fluorescence microscopy reveals a domain of the centrosome critical for pericentriolar material organization. Nat. Cell Biol. 14:1159-1168.
- 68- Annibale P, Vanni S, Scarselli M, Rothlisberger U, Radenovic A. 2011. Quantitative photo activated localization microscopy: unraveling the effects of photoblinking. PloS one 6:e22678.
- 69- Lee S-H, Shin JY, Lee A, Bustamante C. 2012. Counting single photoactivatable fluorescent molecules by photoactivated localization microscopy (PALM). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109:17436-17441.
- 70- Sahl SJ, Moerner W. 2013. Super-resolution fluorescence imaging with single molecules. Curr. Opin. Struct. Biol. 2. ΥΛΥ-Υ:ΥΥΛ
- 71- Zhu L, Zhang W, Elnatan D, Huang B. 2012. Faster STORM using compressed sensing. Nat. Methods 9:721-723.
- 72- Shroff H, Galbraith CG, Galbraith JA, Betzig E. 2008. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. Nat. Methods 5:417-423.
- 73- Jones SA, Shim S-H, He J, Zhuang X. 2011. Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells. Nat. Methods 8:499-505.
- 74- Holden SJ, Uphoff S, Kapanidis AN. 2011. DAOSTORM: an algorithm for high-density superresolution microscopy. Nat. Methods 8:279-280.

"مجله ایمنی زیستی، دوره ۱۰، شماره ۲، تابستان ۹۴"

- 75- Quan T, Zhu H, Liu X, Liu Y, Ding J, Zeng S, Huang Z-L. 2011. High-density localization of active molecules using Structured Sparse Model and Bayesian Information Criterion. Opt. Express 19:16963-16974.
- 76- Punge A, Rizzoli SO, Jahn R, Wildanger JD, Meyer L, Schönle A, Kastrup L, Hell SW. 2008. 3D reconstruction of high-resolution STED microscope images. Microsc. Res. Tech. **71**:644-650.
- 77- Schmidt R, Wurm CA, Punge A, Egner A, Jakobs S, Hell SW. 2009. Mitochondrial cristae revealed with focused light. Nano Lett. 9:2508-2510.
- 78- Shaner NC, Lin MZ, McKeown MR, Steinbach PA, Hazelwood KL, Davidson MW, Tsien RY. 2008. Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. Nat. Methods 5:545-551.
- 79- Wombacher R, Cornish VW. 2011. Chemical tags: applications in live cell fluorescence imaging. J. Biophotonicss 4:391-402.

Recent progress in upgrading optical microscopy resolution: an opening into biological observations at nanoscale

Ali Dinari¹, Elnaz Tamjid^{2*}

1- Ph.D. of Nanobiotechnology, Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat

Modares University, Tehran, Iran Assistant Professor of Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares

University, Tehran, Iran

tamjid@modares.ac.ir

Abstract

2-

The advancement of nanotechnology, as a promising novel technology, have been associated with concerns about biosafety and bioenvironmental issues. Specially, since this technology raises the claim of material manipulation in cellular-molecular-level, and improving biological functions of biomaterials with medical and biotechnological aims. In this regard, the safety of nanostructures and sub-cellular components according to the biological observations, and accurate study of biological mechanisms at the nanometer scale is of critical importance. The advantage of optical microscopy as an important tool in development of science is the ability to observe the living sample models, with minimal disruption to their functions, flexibility, sensitivity, and specificity. However, the limitation is the diffraction of light and its effect on the resolution. Recently, improvement of novel super-resolution imaging methods relying on molecules consisting of a labeled structure as nanometer source of light, has led to a significant reduction of resolution gap between fluorescent and electron microscopy. The images obtained by super-resolution technique contain valuable information in areas such as chromosome studies, genome mapping, membrane transport, cell division, viral infection and cytotoxicity. This article introduces the latest scientific achievements of optical microscopy resolution improvement to the nanoscale with hope to upgrade the general information in different field of biology and medicine.

Keywords: optical fluorescent microscopy, resolution, diffraction, nanometer scale, biosafety.