

Nikon-KOKI Mikroszkóp Központ

Az élettudományi mikroszkópia fejlődése miatt egyre bonyolultabb és összetettebb mérőműszerek alkalmazására van szükség. Az ilyen mérőrendszerekről kiderült már világszerte, hogy a hatékonyság és szakszerűség érdekében egy-egy intézményen belül, egy központi létesítményben célszerű üzemeltetni őket. Az MTA Kísérleti

merziós Apo 40X N.A 1.25; hosszú munkatávolságú víz immerziós Apo 40X, N.A 1.15; olaj immerziós Plan Apo 60X N.A. 1.40). A rendszer élő ideg- és gliasejtek plazmamembránja közelében történő jelátviteli események vizsgálatára alkalmas, kimagasló térbeli felbontással és jel/zaj viszsonnyal. A másik egy FN1 elektrofi-

az optikai rendszer nyújtotta felbontást. A másik tükröcpár a rezonáns letapogató, amely gyors (30 fps/512×512 képpont, 420 fps/512×32 képpont) képalkotást igénylő vizsgálatokat is lehetővé tesz, de elérhető a 15 600 vonal/sec sebesség is. A két tükrörendszer együttes használatára is lehetőség van. Amíg a hagyományos tükrörendszerrel például aktiválunk, addig ugyanabban az időben a rezonáns tükrörendszerrel képet alkothatunk, így feltérképezhetők az aktiválást követő gyors folyamatok.

A konfokális rendszer egy teljesen elektronikusan vezérelhető inverz mikroszkóphoz kapcsolódik, amely szokásos kiépítése az élősejtes megoldásoknak. Az automatikus fókusz nagyban hozzájárul a hosszú ideig tartó mérések egyszerű kivitelezéséhez. Ebben az esetben az automatikus fókusz a fedőlemez és a minta törőfelszínének mozgását (dilatáció, drift) figyeli, és az elmozdulásokhoz igazítja az objektív pozícióját. A sejtek életben maradását egy termosztát és egy széndioxidos kamra segíti. A mikroszkóp egy magyar gyártmányú rezgésmentes asztalon kapott helyet. A konfokális képalkotásra kétféle lehetőség van. Az egyik egy négycsatornás fotoelektron-sokszorozós (PMT) megoldás, a másik lehetőség pedig egy 32 csatornás spektrális képalkotás. A mintából érkező jelet ebben a megoldásban különböző felbontású (10, 6, 2,5 nm) optikai rácsok bontják fel és egy 32 csatornás PMT detektor érzékeli. Mivel a detektálás egyszerre történik, a spektrális képalkotás igen gyors.

FN1-C1 elektrofiziológiai rendszer

A legújabb elektrofiziológiai mérésekhez (kalcium imaging, glutamate uncaging) ma már elengedhetetlen a képalkotás is. A kifejezetten elektrofiziológiai mérésekhez kifejlesztett mikroszkóphoz egy konfokális szkennert tartozik. Az élő agyszeletek egy-egy sejtjéből érkező elektromos jeleket mikropipettával vezetjük el (patch-



Orvostudományi Kutatóintézet a Nikon Austria GmbH és az Auro-Science Kft. egymásban találta meg a partnert ennek a képalkotó központnak a megvalósítására. A megegyezésre 2010 januárjában került sor, utána azonnal megkezdődött a Nikon-KOKI Mikroszkóp Központ (Nikon Microscopy Center at IEM) kivitelezése.

Cégünk a megállapodás keretében, az A1R si konfokális rendszer kiegészítéseként két csúcskategóriájú élettani mikroszkópot bocsájtott az intézet dolgozóinak rendelkezésre. Az egyik egy TIRF-2 rendszer, amely a teljesen automatizált inverz Nikon Ti-E kutatómikroszkópra épül és kiegészül egy négy lézert tartalmazó egységgel, a Tokai Hit Stage környezeti kamrával, az Andor Ixon kamerával és a Nikon legkorszerűbb nanokristály bevonatú Lambda S objektív sorozatával (víz im-

ziológiai rendszer C1-es konfokális fejvel felszerelve, amelyhez egy háromlézeres egység tartozik. A későbbi tervekben a Nikon legújabb, forradalmának számító N-STORM szuperrezolúciós mikroszkóp rendszerének bemutatása is szerepel. Ez a kiegészítés lehetőséget teremt a sejtekben zajló molekuláris folyamatok vizsgálatára 40-60 nm-es térbeli felbontással.

A1R si konfokális rendszer

A mérőrendszer kiválasztásánál szempont volt a nagy felbontás elérése az anatómiai munkákhoz, és a nagy időbeli felbontás az élősejtes vizsgálatokhoz. Ebben a kialakításban két tükrörendszer oldja meg a konfokális képalkotást. Az egyik a hagyományos galvanó letapogató, amely nagyon pontos mozgásával nagy térbeli felbontást (4096×4096 képpont) képes elérni és így nagy látótérrel tudjuk kihasználni

clamp technika), amelyeket mikromanipulátorok segítségével juttatunk a kiválasztott sejthez. A sejtek láthatóvá tételéhez elengedhetetlen valamilyen kontraszt eljárást alkalmazni, amely ebben az esetben az infravörös DIC megoldás, ezzel, a szeletben mélyen elhelyezkedő (100-300 µm) sejteket is láthatóvá lehet tenni. A fluoreszcensen jelölt sejtek kiválasztását a konfokális rendszer segíti és a stimulálásra adott válaszok is követhetők. Mivel a DIC az infravörös tartományban működik, a konfokális pedig a láthatóban, ezért megfelelő dikroikus tükör használatával megoldható az egyidejű képalkotás. A fűthető környezeti kamrához perfúziós rendszer csatlakozik, amelynek segítségével a sejtek életben tartathatók és egyúttal drogok adagolására is lehetőség nyílik.

Ti-E TIRF-2 mikroszkóp

A fluoreszcens mikroszkópiában számos biológiai vagy fizikai mechanizmus teszi indokolttá a vékony rétegekben történő folyamatok vizsgálatát. A fókuszsíkon kívül eső fluorofórok emissziójából származó háttér kiszűrésével sokkal jobb jel/zaj arány érhető el, amely természetesen növeli a térbeli felbontást is.

A teljes belső visszaverődéses fluoreszcencián (Total Internal Reflection Fluorescence TIRF) alapuló mikroszkópia éppen olyan problémákra ad választ, mint a sejtek membránjában történő folyamatok megfigyelése. A TIRF mikroszkópia a fénynek azt a különleges tulajdonságát használja fel, amikor a fény egy törőfelületre egy kritikusnál nagyobb szögben érkezik, teljes visszaverődést szenved, így a fény közvetlenül nem hatol be a törőfelszín alá. A TIRF mikroszkópia azért működhet mégis, mert a törőfelszínt jelentő fedőlemez-minta határvonalon mégis átjut egy evanescens hullámnak nevezett, nagyon gyorsan elhaló elektromágnesség. Az evanescens hullám a visszaverődő fény hullámhosszától és beesési szögétől függően 50–200 nm mélységben képes behatolni a mintába és gerjeszteni az ott lévő fluorofórokat. A fedőlemezre kitapadt sejtek membránjában zajló folyamatok figyelhetők meg ilyen módon, kiváló z irányú felbontással és a mélyebb rétegek gerjesztésének hiányában kiváló jel/zaj aránnyal.

A TIRF megvilágítás egy teljesen motorizált inverz mikroszkópra van felszerelve, és az élő sejtek hosszú távú életben tartásához szükséges környezeti kamra is rendelkezésre áll.

Az igen vékony rétegből érkező fluoreszcens jel meglehetősen gyenge, így különleges kamerára van szükség a megfelelő detektáláshoz. Ahhoz, hogy a megfelelő jel/zaj arány megmaradjon, egy –80 °C-ra hűtött, 512×512 képpontos, EM-CCD érzékelővel ellátott kamerát használunk.

Ennek a mikroszkópnak a tulajdonságai alkalmasak arra, hogy átalakítható legyen a napjaink legnagyobb áttörésének számító szuperrezolúciós mikroszkóppá vagy másképpen nanoszkóppá.

A labor elérhetősége, a műszerek pontos specifikációja megtalálható az NKMK weblapján: www.nikonmicroscopycenter.hu, vagy érdeklődjön a Nikon mikroszkópok magyarországi forgalmazójánál.

Auro-Science Kft.