

KROMATIKUS OFFSET VIZSGÁLATA SZUPERREZOLÚCIÓS LOKALIZÁCIÓS MIKROSKÓPIÁBAN

TDK dolgozat

Szerző:

Varga Dániel, *fizikus MSc szakos hallgató*

SZTE TTIK, Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék

Témavezetők:

Dr. Erdélyi Miklós, egyetemi adjunktus, SZTE TTIK Optikai és

Kvantumelektronikai Tanszék

Sinkó József, PhD. hallgató, SZTE TTIK Optikai és Kvantumelektronikai
Tanszék

2014

Szeged

Tartalomjegyzék

Bevezetés	3
Elméleti háttér.....	5
<i>Kromatikus offset</i>	11
Célkitűzés	12
Felhasznált módszer	13
Eredmények	17
Konklúzió	20
Appendix 1	21
Köszönetnyilvánítás	23
Referenciák	24

Bevezetés

Ernst Karl Abbe neve leginkább a mikroszkópok feloldására vonatkozó formuláról ismert, amit 1873-ban publikált [1]. Ennek alapján megjelentek a különböző, mikroszkópok feloldására vonatkozó formulák, mint például a Rayleigh- vagy Sparrow-kritérium. Sokáig ezeket tartották számon, mint két még éppen felbontható tárgy közötti távolság meghatározói, amik alapján a mai mikroszkópok elérték a kritériumok alapján felállított néhány 100 nm-es feloldási határt. Ennek eléréséhez a geometriai optikai úton is magyarázható lencsehibákat az optikai rendszer minőségének javításával minimálisra kell csökkenteni. Ekkor beszélünk diffrakció limitált leképezésről, vagyis a fény hullámtermészetéből adódó elhajlás a feloldásnak a fenti kritériumok értelmében mindenképp határt szab.

A finomabb struktúrák láthatóvá tételére viszont az idő előre haladtával egyre nagyobb volt a motiváció, különösen a mikro- illetve nanobiológiai kutatásokban, ugyanis sok biológiai funkció függ kritikusan a szövetek molekuláris szerkezetének finom részletein. Különösen igaz ez az idegrendszer szöveteiben, ahol az információfeldolgozási folyamatok a bonyolult hálózatoktól és a szinaptikus architektúráktól függenek. Szinapszisok szerkezetének vizsgálata molekuláris képfeloldást, és specifikus megfigyelést igényel, ami mindig is kihívást jelentett a hagyományos leképezési technikáknak.

Nagyfeloldású képek készítéséhez egyik eszköz az elektronmikroszkóp, de a minta előkészítése komplikált, drága nem csak a készülék, de üzemeltetése is, illetve az élő sejt megfigyelések nehezen, vagy egyáltalán nem kivitelezhetőek, mivel a tárgyeret vákuumban kell tartani használat közben. Másik lehetőség a szuperrezolúciós mikroszkópok alkalmazása. A hagyományos feloldási határokat átlépő, azoknál jobb feloldást ígérő technikákat szuperrezolúciós mikroszkópiai technikáknak hívjuk [2]. Ezek közül én a lokalizációs mikroszkópiával foglalkoztam. A lokalizációs mikroszkópia 2006-os kifejlesztése óta a figyelem középpontjában áll. 2008-ban a *Nature Methods* folyóirat az év módszereként jellemezte és az idei, 2014-es kémiai Nobel-díjat is ennek a területnek a kifejlesztéséért ítélték oda.

Ennek oka számos előnyének köszönhető. Ezek között megemlítendő, hogy optikai tartományban kínál tipikusan pár tíz nanométeres feloldást. Másik nagy előnye, hogy nem igényel bonyolultabb minta előkészítést és lehetőséget nyújt élő sejt kísérletekre, folyamatokat figyelhetünk meg in vivo. Ezen felül lehetővé teszi a szelektív megfigyeléseket. Szelektív megfigyelésen azt értem, hogy a minta különböző elemeit

különböző fluoreszcens molekulákkal megjelölve az alkotók megkülönböztethetővé válnak. Valamint a lehetőség, hogy képesek vagyunk vele 3D-s képek készítésére, szintén jelentősen hozzásegít a molekuláris sejten belüli folyamatok megértéséhez.

Az intenzív fejlődéssel azonban együtt jár a problémák és gyenge pontok felszínre kerülése, amelyek kiküszöbölést vagy korrekciót igényelnek. A hagyományos optikai mikroszkópiában is alkalmaznak korrekciókat, de mivel a feloldásban nagyjából egy nagyságrenddel lejjebb mentünk, ezért pontosabb korrigálás szükséges, illetve olyan hatásokat kell számításba venni, ami kisebb feloldásoknál elhanyagolható. Ez egy viszonylag új módszer és a kutatók egyik fontos feladata a technikai limitek körbejárása, határainak megkeresése a lehetséges alkalmazási területek felderítése mellett (amik eddig leginkább biológiai alkalmazások).

Mint korábban említettem, a lokalizációs mikroszkópia egyik nagy előnye, hogy lehetőséget ad szelektív megfigyelésre. Eltérő hullámhossz tartományban sugárzó molekulák esetén megjelenik a kromatikus aberráció, ezért ezt vizsgáltam meg. Kétféle színi hibáról beszélhetünk, axiális és laterális (melyekről a *Kromatikus offset* alfejezetben bővebben írok).

A laterális kromatikus aberráció hatására egy molekula képe máshova kerül a detektoron, attól függően, hogy milyen hullámhosszúságú fényt emittál. Hagyományos fluoreszcens mikroszkópoknál a hiba elhanyagolható, azonban a szuperrezolúciós technikáknál elért feloldásoknál és többszínű kísérleteknél már a kép félreértelmezéséhez vezethet.

Kutatómunkámban a kromatikus hibából adódó ún. kromatikus eltolódást (offsetet) vizsgáltam behatóan. Dolgozatomban egy rövid elméleti áttekintést adva, célkitűzésem és módszereim ismertetése után ebben elért eredményeimet közlöm. Miután a konklúziókat levontam, röviden ismertetem a kutatás fontosabb vonzatait, a továbblépési lehetőségeket.

Elméleti háttér

A Bevezetésben láttuk, hogy a képesség, hogy a nanométeres tartományban vizualizáljunk például biológiai struktúrákat, jelentősen segíti a világunk megértésében elért eredményeinket. Felvetődik tehát a kérdés, hogy a nagyítást meddig lehet növelni, illetve van-e határa a térbeli feloldásnak.

Bármely leképezendő tárgy tekinthető ideális pontszerű fényforrások halmazaként. Azonban az optikai rendszerünk hibáiból, illetve a fény hullámtermészetéből adódóan egy pontszerű fényforrás képe nem egy pont, hanem egy kiterjedt folt lesz, aminek pontos alakját a leképező rendszer jellemzi. Ennek a foltnak a képét, vagyis a rendszer válaszát a pontforrásra egyértelműen le lehet írni a pontátviteli függvény (PSF, Point Spread Function) segítségével. A tárgyról kapott képünk tehát a tárgy egyes pontjainak a PSF-el vett konvolúciója lesz. Ennek következtében a kép elmosódottabbá válik, és morfológiai információk vesznek el.

Az elméleti felbontóképesség kvantitatív meghatározására a történelem folyamán több definíció is született, amelyek közül a legelterjedtebbek a Rayleigh- illetve a Sparrow-kritériumok, amik a leképező rendszer által még éppen feloldható pontszerű objektumok távolságát, vagyis a kritikus távolságot (CD, Critical Distance) határozzák meg az alábbi formulák segítségével:

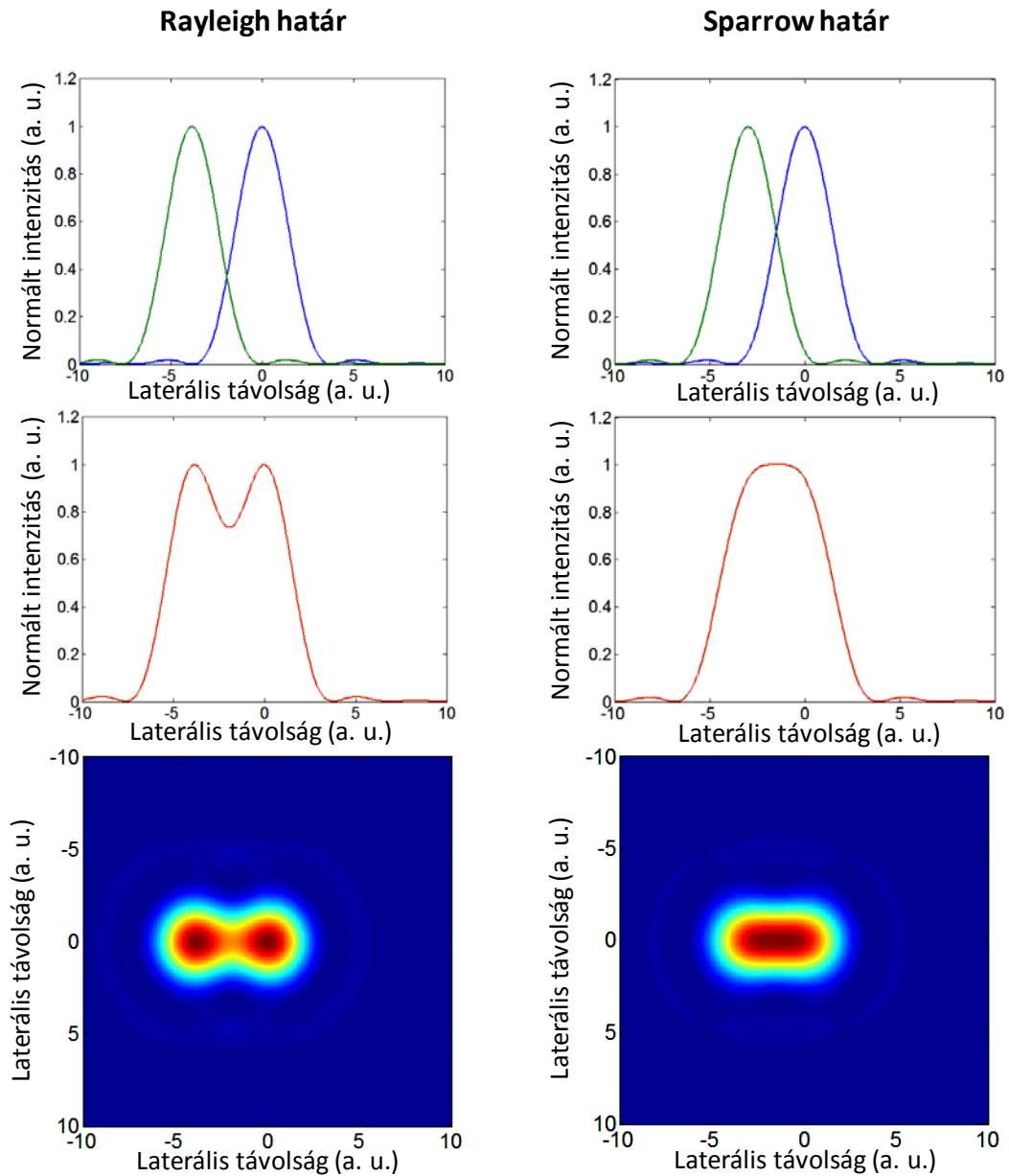
$$CD_{Rayleigh} = 0,61 \cdot \frac{\lambda}{NA} \quad (1)$$

$$CD_{Sparrow} = 0,47 \frac{\lambda}{NA} \quad (2)$$

ahol λ a megfigyelt foton hullámhossza, NA pedig a leképezéshez használt optikai rendszer numerikus apertúrája. A numerikus apertúra az optikai rendszert jellemző dimenziótlan szám. Kiszámítása:

$$NA = n \cdot \sin(\theta) \quad (3)$$

ahol n a közeg törésmutatója, amiben a lencse elhelyezkedik, θ a maximális fénykúp szögének fele, ami még be tud lépni a lencsébe vagy ki tud lépni abból.



1. ábra: Rayleigh- és Sparrow-féle feloldási határok szemléltetése két pontforrás segítségével [3].

A Rayleigh-kritérium esetén a CD az a távolságra elhelyezkedő két pontszerű objektum PSF-jei közül az egyiknek főmaximuma egybeesik a másik első minimumával (1. ábra első oszlopa). A Sparrow-kritérium esetén a CD az a távolságra elhelyezkedő két pontforrás képénél éppen eltűnik a PSF-ek közötti lokális minimum (1. ábra második oszlopa).

A feloldási határ (1) és (2) formulák által adott kiszámításait figyelembe véve a laterális irányú feloldás javítására két kézenfekvő út látszik: A hullámhossz csökkentése, illetve a numerikus apertúra növelése. Az egyik oldalról nehézség, hogy a rövidebb hullámhosszak felé való elmozdulás során egyre kevesebb anyagot találunk, ami ebben a tartományban jól

transzmittál, tehát az optikai elemek gyártása problémás. További nehézségek, hogy a nagyobb energiájú fotonok miatt megnő a fény mintaroncsoló hatásának esélye, biológiai minták esetében a fototixicitás, ami gátolja az élő sejt kísérleteket, illetve az autofluoreszcencia, aminek következtében nagyszámú molekula sugároz egyszerre, ami a lokalizációs mikroszkópai eljárást lehetetlenné teszi. Másfelől a numerikus apertúra növelésének szintén technikai akadályai vannak. A kereskedelmi forgalomban kapható, legnagyobb numerikus apertúrájú, olaj immerziós objektív numerikus apertúrája: ~1,4-1,49.

Axiális irányban a feloldást a rendszer mélységélessége (DOF, Depth of Field) határozza meg. Nagysága, hasonlóan a laterális irányú feloldáshoz, függ a numerikus apertúrától (NA) és a hullámhossztól (λ):

$$DOF = 2 \frac{\lambda}{NA^2} \quad (4)$$

A fentebb definiált limitek miatt a fénymikroszkópok klasszikusan 200-300 nm-es laterális, és 500-800 nm-es axiális feloldással rendelkeznek. Azonban mindkét kiterjedés lényegesen nagyobb, mint a legtöbb sejten belüli struktúra. A diffrakció tehát gátolta ezeknek a tanulmányozását egészen addig, amíg meg nem jelentek a szuperrezolúciós mikroszkópai eljárások. A korábban ismertett kritikus távolságok csökkentése azért vált lehetségessé, mert a hagyományos feloldásra adott elméleti határok csupán definíciók, nem fizikai törvények. Nem vesznek figyelembe bizonyos napjainkban fontossá vált paramétereket, például a detektor pixelméretét vagy a beérkező fotonok számát. Bizonyos trükköket alkalmazva tehát ezek a korlátok meg is kerülhetők.

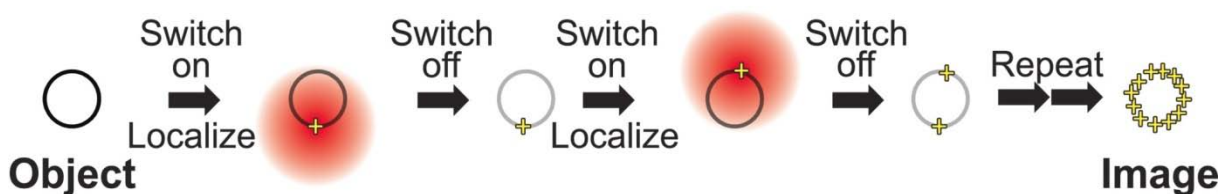
A legtöbb leképezési technikában nagyszámú molekula egyidejű megfigyeléséről van szó, ami eleve korlátozza a feloldást, mert az észlelt molekulák közötti távolság sokkal kisebb, mint a CD. Újabb képalkotó eljárások, mint például a 4Pi mikroszkópia [4], a STED [5, 6], a RESOLFT [7] vagy a SIM [8] mikroszkópok csökkenteni tudják a CD-t a megfigyelt vagy gerjesztett térfogat csökkentésével, vagy növelve a hozzáférhető Fourier teret (a hozzáférhető térbeli frekvenciák számát) egy ismert mintázatú kivilágítással.

A lokalizációs mikroszkópai eljárások (PALM, STORM, dSTORM, stb.) [9-14] esetében lényegében fluoreszcens mikroszkópiáról beszélhetünk, de nem sok fluorofór együttes leképezésén alapul, hanem fotokémiai folyamatok révén időben szétválasztjuk az egyes molekulák detektálását. Ez úgy válik lehetségessé, hogy a mintát jelölő festékmolekulákat fluoreszcens (aktív) és nem fluoreszcens (passzív) állapotok között lehet kapcsolgatni. A

molekuláknak lehet egy harmadik állapota is, a bleached, amikor a festékmolekula szétesett. Ez egy irreverzibilis folyamat. A mintát bizonyos sűrűséggel megfestjük ezekkel a molekulákkal és gerjesztő fénnel megvilágítva az aktív molekulák gerjesztett állapotba kerülnek. Alapesetben a festékmolekula gerjesztődés után vagy újra alapállapotba kerül egy fluoreszcens foton emissziója révén, vagy bizonyos besugárzó intenzitástól függő valószínűséggel egy metastabil állapotba jut, ahonnan újra a kiindulási, fluoreszcencia-képes alapállapotba kerül. A dSTORM lokalizációs mikroszkópiában a mintát ún. puffer oldatba helyezzük, ami a festékmolekulák mikrokörnyezetének megváltoztatását szolgálja. A puffer oldat hatására a passzív állapotok élettartama megnövekszik. A folyamat során tehát a molekulák villódzását lehet megfigyelni. Ezt lényegében egy videó felvétellel rögzítjük. A kamera expozíciós idejét optimálisan megválasztva elérjük, hogy az egyes képkockákon a felvillanások detektoron létrehozott képei kis valószínűséggel fedjenek át, lehetőséget adva a lokalizációra.

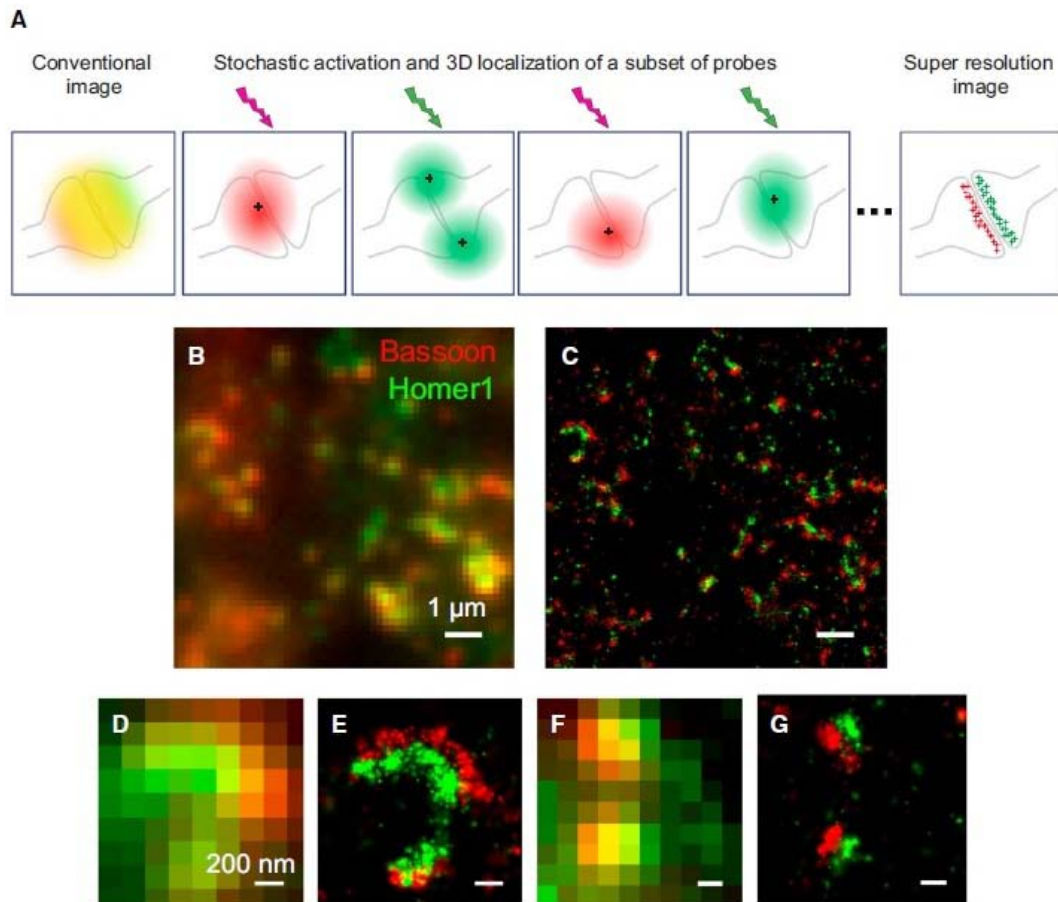
Az egyes képkockákon különböző számítógépes algoritmusokkal a fluoreszcens festékekhez tartozó pontátviteli függvényekre alkalmas függvényt illesztve meghatározzuk azok helyzetét (ami az illesztett függvény maximumának helye lesz). Sok képet készítve (~10000 képkocka) és a pozíciókat eltárolva és egy képen megjelölve, létrehozhatunk egy nagy feloldású képet a mintában elhelyezkedő molekulákról. A laterális feloldás ezzel a módszerrel jelenleg 20-30 nm. A folyamat sematikus ábrája a 2. ábrán látható.

Mivel a folyamat során egy molekula relatíve gyengén emittál, meg kell jegyezni, hogy ennél a módszernél kevés foton detektálására alkalmas kamerákat használnak. Ilyen például az EMCCD (Electron Multiplying Charge-coupled Device), vagy a sCMOS (Scientific Complementary Metal-Oxide Semiconductor). A pixelméretek átlagosan 16-24 μm -esek.



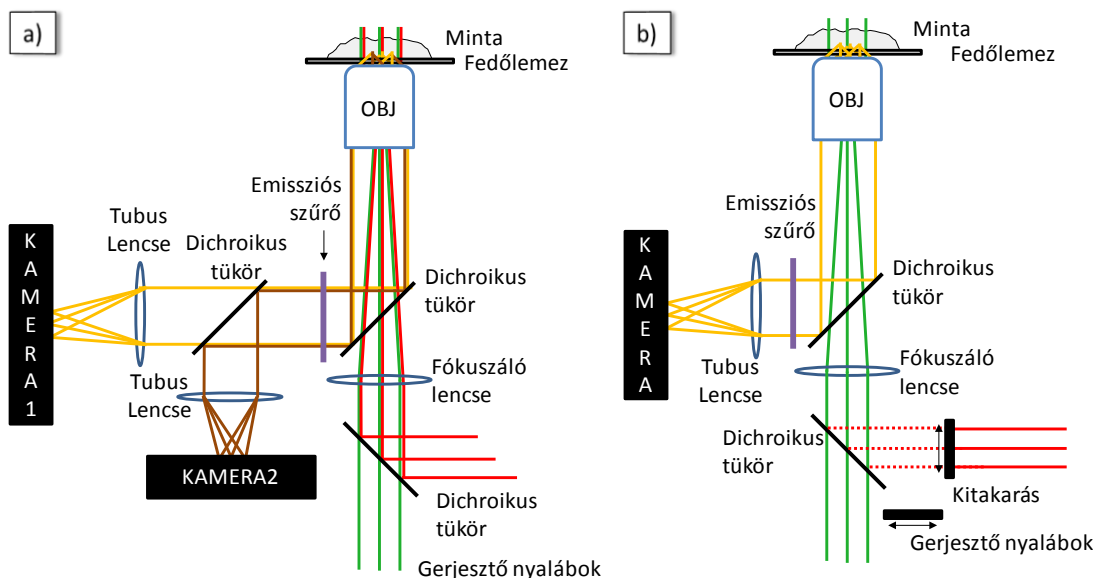
2. ábra Az egymolekula képképzés elve, amin a lokalizációs mikroszkópia alapul és a festékmolekulák állapotai közötti kapcsolások, amiket a módszer használ. A folyamat egy diffrakció limitált feloldásnál kisebb gyűrű alakú tárgy leképezését szemlélteti [15].

Egy valós példa a lokalizációs mikroszkópia biológiai alkalmazásaiból, amikor preszinaptikus proteinek leképezése történik (3. ábra):



3. ábra: STORM képalkotás Pre- és Postszinaptikus fehérjék (A) 3D STORM sematikus ábrája. (B-G) Preszinaptikus proteinek. A hagyományos fluoreszcenciás felvétel (B) részlegesen átfedő mintázatokat mutat, míg a STORM kép (C) ugyanarról a területről egyértelműen felbontja a különálló szinaptikus struktúrákat. További nagyítás hatására a hagyományos képek (D és F) nem adnak további információt, míg a STORM képek (E és G) jól megkülönböztethető csoportosulások jelenítenek meg [16].

A minta előkészítése során lehetőség nyílik arra, hogy specifikus kötéseket alkalmazva a különböző biológiai objektumokat más fluoreszcens molekulákkal jelöljük meg, így különböző színekben tudjuk leképezni azokat. Ezzel lehetőség nyílik például dinamikai vizsgálatokra. Ilyen többszínű kísérleteknél kétféle módszert szoktak alkalmazni, az egyik a szimultán vagy többcsatornás (4. ábra (a) része), a másik a szekvenciális vagy egycsatornás (4. ábra (b) része) leképezés.



4. ábra Szimultán (többsatornás) (a) és szekvenciális (egysatornás) (b) leképezésen alapuló mikroszkópiai technika [3].

Szimultán többsatornás módszer során több hullámhosszal egyszerre történik a gerjesztés, és a detektor karban egy dichroikus tükör segítségével választhatók szét a különböző színű fluoreszcens képek, melyeket vagy különálló kamerákkal rögzítenek, vagy pedig a képeket egyetlen kamera különböző területeire irányítják, ez csökkentheti a képtér (FOV, Field Of View) méretét. A képek szétválasztásához szükséges plusz optikai elemek fényvesztéseket jelentenek és aberrációkat vezethetnek be, azonban relatíve gyors módszer.

Szekvenciális, egysatornás rendszerben egyszerre csak egy hullámhosszon történik a gerjesztés és a különböző színű képeket egymás után képezik le a CCD kamera chipjére, így a teljes aktív felületet kihasználhatjuk, valamint a fényutakat sem kell különválasztani. Hátránya viszont, hogy a mérési idő megnövekszik az előző módszerhez képest, ami a lokalizációs mikroszkópiában, ahol a random mechanikai elmozdulások (drift, pl.: hőtágulás miatt) összemérhetőek a feloldással, problémát jelent és korrekciót igényel.

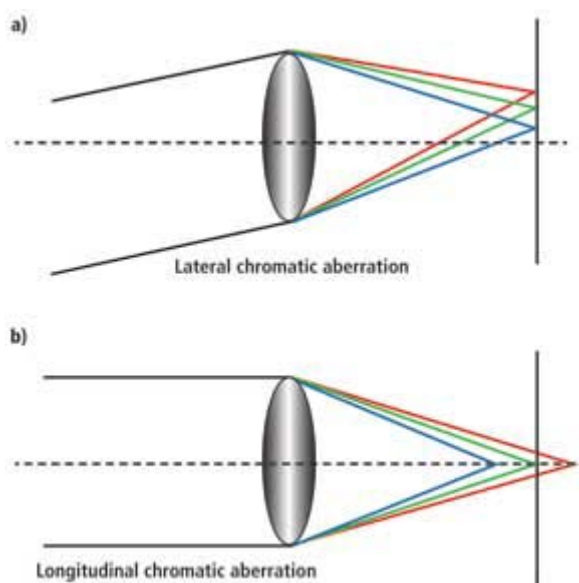
Többszínű leképezésnél fontos a különböző színű képek pontos illesztése, a regisztráció. Erre azért van szükség, mivel a fellépő aberrációk miatt a képek nem illeszkednek tökéletesen. Ennek egyik legszignifikánsabb okozója a kromatikus aberráció. A képek illesztésekor megszokott, hogy referenciapontokat, például arany nanorészecskéket helyeznek el a mintában. A kevés számú foton miatt használt érzékeny kamerákat viszont károsíthatja a fém nanorészecskék erős sugárzása, ezt figyelembe kell venni.

Kromatikus offset

Az optikai rendszerben fellépő leképezési hibák a szuperrezolúciós mikroszkópiában különösen jelentőssé válnak, hiszen a nagy feloldás legalább olyan mértékű precizitást igényel.

Az öt monokromatikus ún. Siedel aberráció [17] a szférikus hiba, az asztigmia, a kóma, a Petzval hiba és a torzulás. Ezek önmagukban nem módosítják a lokalizációs pontosságot, csak torzítják a képet, ami általában nem vezet félreértésekhez, nem gátja a megértésnek. Többszínű leképezés esetén viszont már fellépnek a kromatikus aberrációk is és ezeknél már nem lesz igaz a monokromatikus hibákra vonatkozó állítás. A torzítás hullámhossz függő, és ennek mértéke a lokalizációs technikában elért feloldásoknál már számottevő. Így a különböző társulások, együttállások nem ismerhetők fel, a detektálások széteshetnek a különböző színekben.

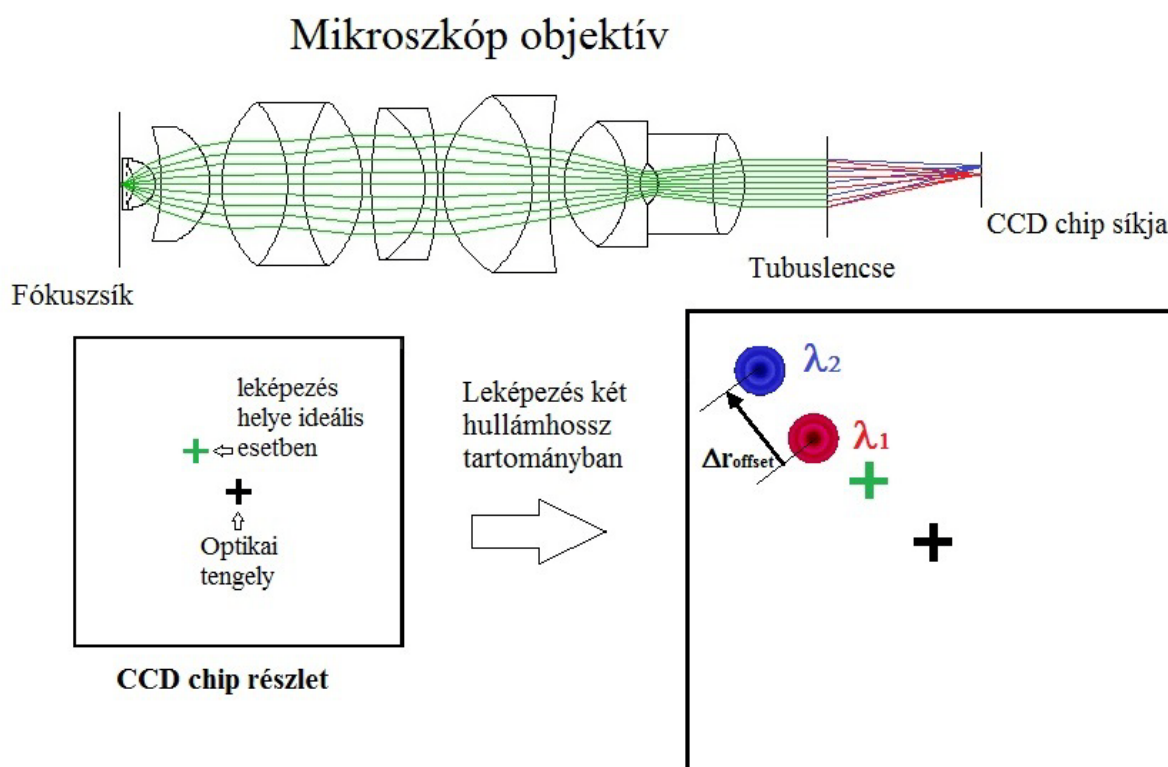
A kromatikus aberrációk az anyagok azon fontos tulajdonságából következnek, hogy a törésmutatójuk függ a hullámhossztól: $n(\lambda)$. Ezt nevezzük diszperzióknak. Ennek egyik következménye, hogy egy lencse a különböző hullámhosszúságú nyalábokat különböző helyekre fókuszálja (axiális kromatikus aberráció). Ezt lehet korrigálni lencserendszerekkel, de megjelenik egy másik diszperzió okozta hiba. Ha el is értük, hogy az optikai rendszer a különböző hullámhosszúságú nyalábokat egy síkba fókuszálja, a különböző színekre más lesz a nagyítás (laterális kromatikus hiba).



5. ábra: Az axiális és laterális kromatikus aberráció szemléltetése [18].

Laterális kromatikus hiba hatására egy pontszerű tárgy képe eltolódik a detektoron. Ennek az eltolódásnak a mértéke függ az objektum pozíciójától, és az általa kibocsátott sugárzás hullámhosszától. Dolgozatomban ezt az eltolódást határoztam meg. Ilyen módon két különböző hullámhossztartományban sugárzó pontforrás lokalizált pozíciói közötti távolságot neveztem kromatikus offsetnek:

$$\Delta r_{offset} = r_{offset}(x, y, \lambda_1) - r_{offset}(x, y, \lambda_2) \quad (5)$$



6. ábra Kromatikus offset szemléltetése.

Célkitűzés

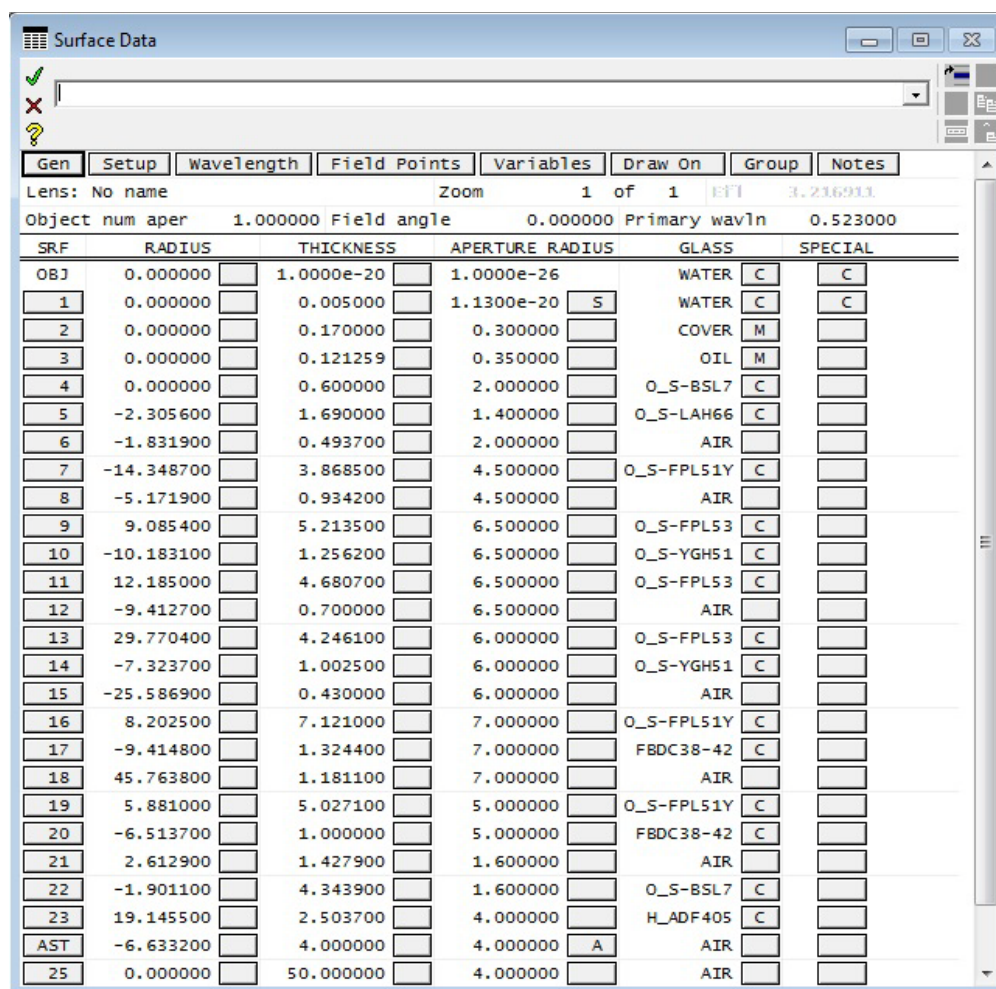
Céлом a színi hibából adódó kromatikus offset modellezése és számítógépes programokkal szimulációk végzése volt, annak reményében, hogy az ebből szerzett információkból és az esetleges új ismeretekből megoldást találjak a hiba megszüntetésére vagy csökkentésére.

Az effektust a Szegedi Tudományegyetem AdOptIm kutatócsoportja fókusz síkban már megvizsgálta [19], azonban az axiális irányú függés vizsgálatára idáig nem került sor. Feladatom tehát a megfelelő modell megtalálása, a szükséges programok megírása illetve a már létező programok megismerése, az optikai offset leszimulálása, és a konklúziók levonása volt.

Felhasznált módszer

A vizsgálódásaim során OSLO-t [20] használtam, ami egy optikai rendszer tervező és optimalizáló program. Az offset meghatározásához először is modelleztem a folyamatot. A molekulákat ideális pontforrásnak tekintettem, és feltételeztem, hogy az emissziójuk független a gerjesztési körülményektől, mint például a polarizáció, így a véletlenszerűséget imitálva cirkulárisan poláros emittált fénnel számoltam. Az OSLO a leképezéshez sugárkövető számításokat és hullámoptikai megfontolásokat alkalmaz. A leképezéshez egy 640 nm-re optimalizált 100-szoros nagyítású mikroszkóp objektív modellt használtam. A fókusz sík pedig 5 μm mélyen volt a mintában. A detektáláshoz egy 256×256 pixeles, 16 μm pixelméretű EMCCD kamerát feltételeztem [21].

Az alábbi képen a grafikus kezelőfelület látható. Fölről lefele haladunk a tárgysíktól a képsíkgig, balról jobbra pedig rendre a felület görbületi sugarát, a lencse vastagságát, apertúráját és anyagát határozhatjuk meg.

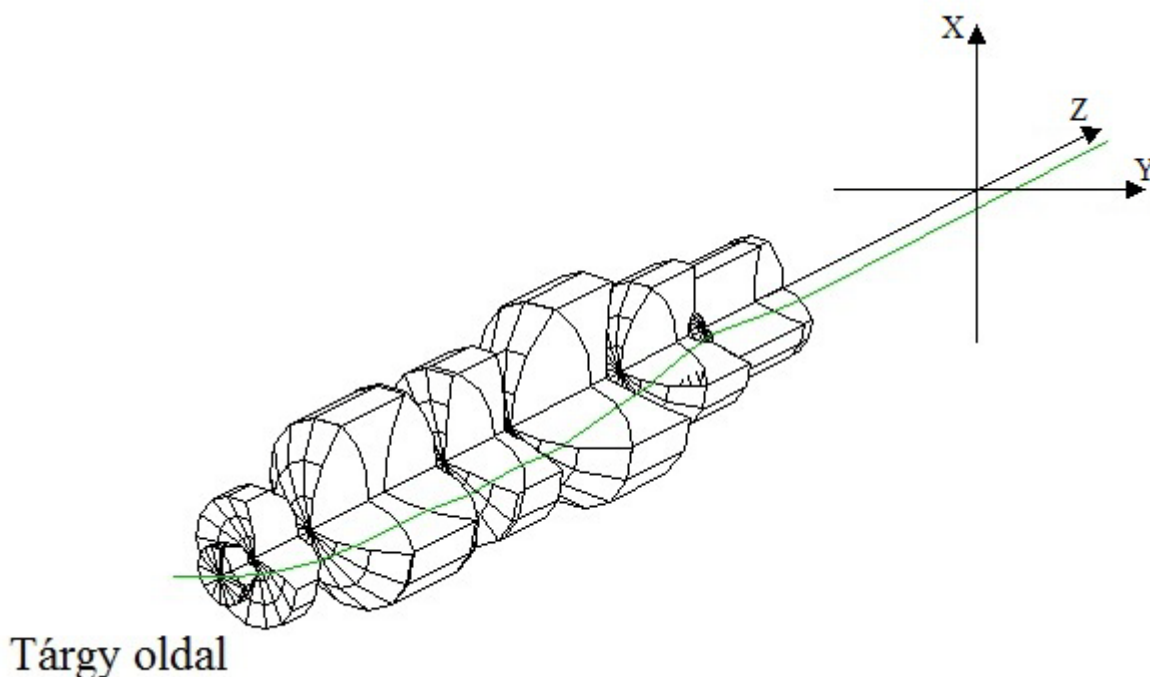


The screenshot shows the 'Surface Data' window in OSLO. It contains a table with columns: SRF, RADIUS, THICKNESS, APERTURE, RADIUS, GLASS, and SPECIAL. The table lists 25 surfaces, including object, lens, and detector surfaces, with their respective radii, thicknesses, apertures, and materials.

SRF	RADIUS	THICKNESS	APERTURE	RADIUS	GLASS	SPECIAL
OBJ	0.000000	1.0000e-20	1.0000e-26		WATER	C
1	0.000000	0.005000	1.1300e-20	S	WATER	C
2	0.000000	0.170000	0.300000		COVER	M
3	0.000000	0.121259	0.350000		OIL	M
4	0.000000	0.600000	2.000000		O_S-BSL7	C
5	-2.305600	1.690000	1.400000		O_S-LAH66	C
6	-1.831900	0.493700	2.000000		AIR	
7	-14.348700	3.868500	4.500000		O_S-FPL51Y	C
8	-5.171900	0.934200	4.500000		AIR	
9	9.085400	5.213500	6.500000		O_S-FPL53	C
10	-10.183100	1.256200	6.500000		O_S-YGH51	C
11	12.185000	4.680700	6.500000		O_S-FPL53	C
12	-9.412700	0.700000	6.500000		AIR	
13	29.770400	4.246100	6.000000		O_S-FPL53	C
14	-7.323700	1.002500	6.000000		O_S-YGH51	C
15	-25.586900	0.430000	6.000000		AIR	
16	8.202500	7.121000	7.000000		O_S-FPL51Y	C
17	-9.414800	1.324400	7.000000		FBDC38-42	C
18	45.763800	1.181100	7.000000		AIR	
19	5.881000	5.027100	5.000000		O_S-FPL51Y	C
20	-6.513700	1.000000	5.000000		FBDC38-42	C
21	2.612900	1.427900	1.600000		AIR	
22	-1.901100	4.343900	1.600000		O_S-BSL7	C
23	19.145500	2.503700	4.000000		H_ADF405	C
AST	-6.633200	4.000000	4.000000	A	AIR	
25	0.000000	50.000000	4.000000		AIR	

7. ábra OSLO grafikus kezelő felülete, a felületek megadása.

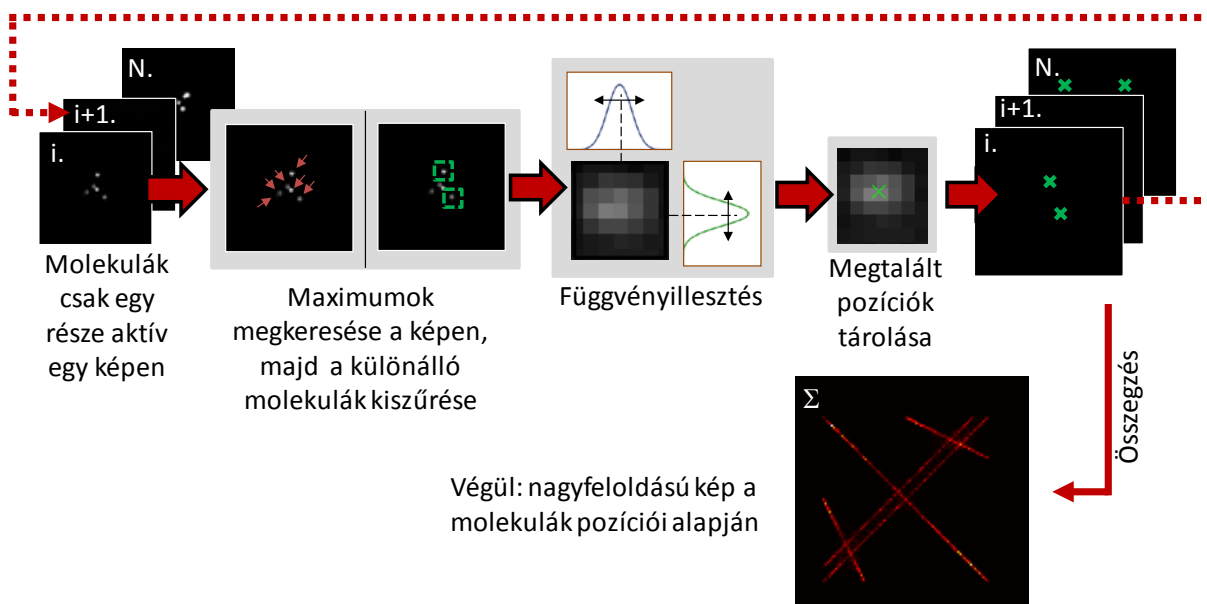
Az OSLO az alábbi ábrán látható módon veszi fel a koordináta rendszert, és dolgozatomban ezen koordinátákkal adtam meg a vizsgált tárgy pont helyét. Az origó a tárgyoldali fókuszpontban van.



8. ábra OSLO által felvett és a dolgozatomban használt koordináta-rendszer illetve az objektív, mint lencserendszer modellje.

Első lépésként MATLAB-ot [22] használtam, hogy egy adatfájlt hozzak létre, ami a sugárzó molekulák (emitterek) koordinátáit tartalmazza. Ezeket az adatokat beolvastattam OSLO-ba, amiben egy ccl fájl (Appendix 1) segítségével kiszámoltattam minden egyes emitterhez tartozó, az adott optikai rendszer által létrehozott PSF helyét és alakját. Ezt a fájlt MATLAB-ban TIFF fájlra konvertáltam. A TIFF fájlkon lefutattam a lokalizációs algoritmust, amihez rainSTORM-ot [23, 24] használtam.

A rainSTORM egy MATLAB-ban futtatható, ingyenesen elérhető lokalizációs mikroszkópiához íródott szoftver, amibe a képkockákat beolvasva létrehozhatjuk a nagyfeloldású képet. A lokalizálásnál az egyes képeken megkeresi a lokális maximumokat, mint lehetséges molekulaképeket, amik a detektor miatt pixelizáltak jelennek meg. Ezek környezetére alkalmas függvényt illeszt. Az egzakt pontátviteli függvény helyett Gauss haranggörbe alakú függvényt használ. Ez kellően pontos modell [25], illetve további előnye, hogy egyszerű és nem igényel nagy számolási időt. Az illesztett függvények maximumának helyét a program a különböző felhasználó által megadható kritériumoktól függően eltárolja vagy elveti. Az eltárolt koordinátákat egy virtuális pixelhálón helyezi el, aminek pixelmérete tizede a valóságos detektor chip méretének.



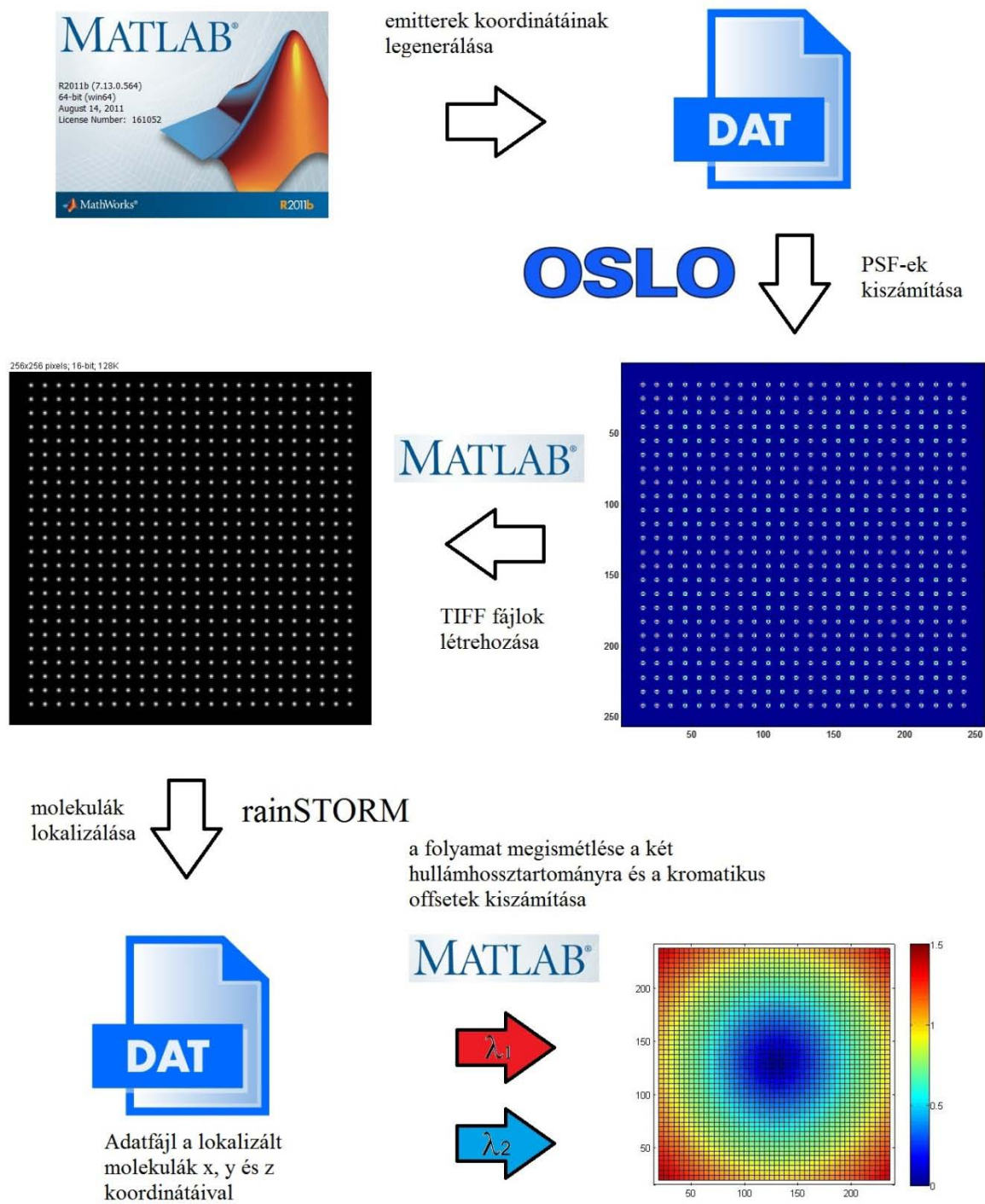
9. ábra: A rainSTORM működési elve [25].

Ezeket a számításokat két hullámhossztartományra végeztem el, két jellemző lokalizációs mikroszkópiában használatos festékmolekulát feltételezve: Alexa 647, Alexa 488. A hullámhossztartományokat egy gyakran használt dichroikus szűrő paramétereit alapján állapítottam meg (Di01-R405/488/561/635-25x36 és FF01-446/523/600/677-25, Semrock).

1. táblázat: Az OSLO-ban alkalmazott hullámhosszak

Gerjesztő hullámhosszak [nm]	Alkalmazott hullámhosszak az OSLO-ban a leképezésnél [nm]		
	λ_1	λ_2	λ_3
491	523	502	544
640	676	663	690

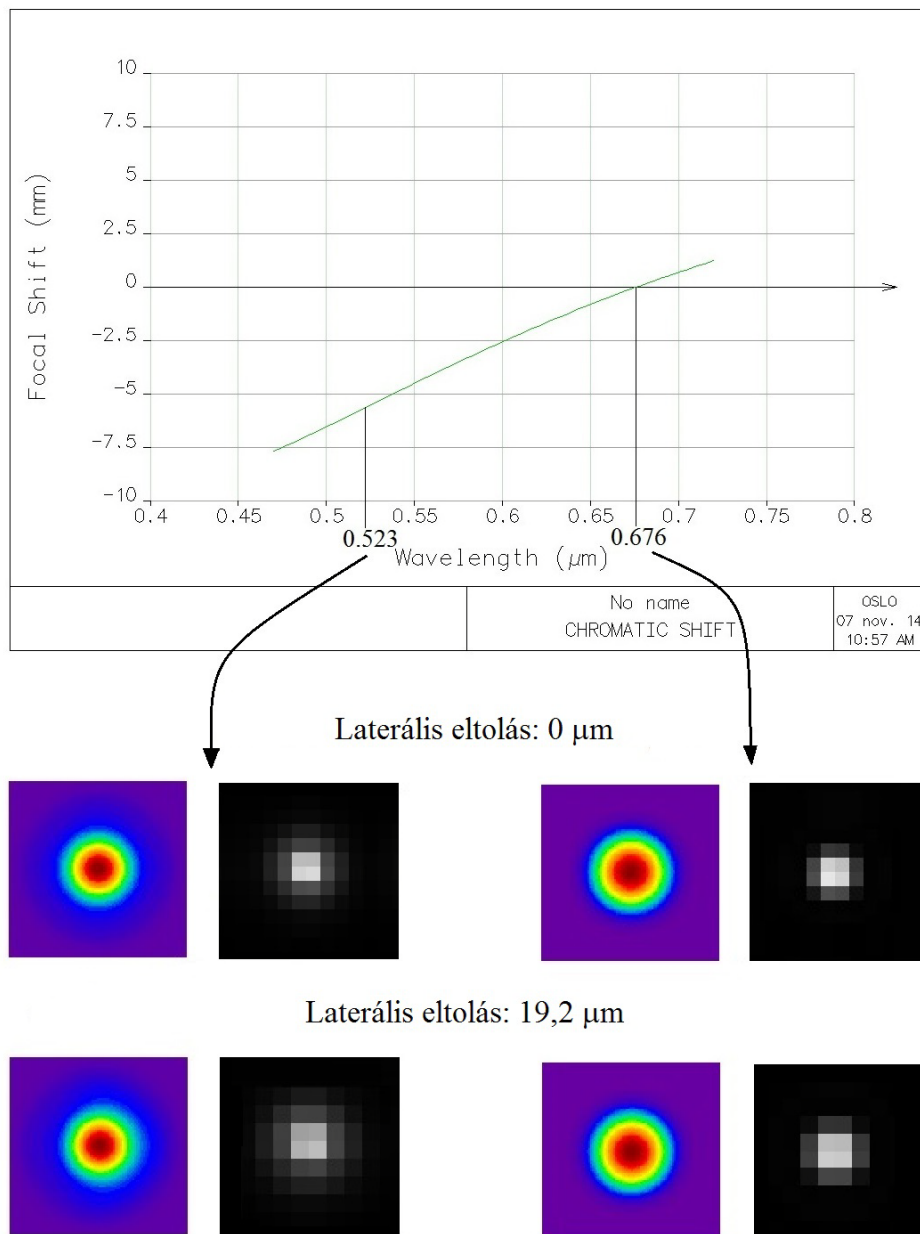
A 640 nm-es gerjesztő hullámhosszhoz tartozó lokalizációs koordinátákat vettem referenciának, a további lokalizációk ettől való eltérését vettem a kromatikus offsetnek, amit MATLAB-ban írt programmal számoltattam ki és ábrázoltam (10. ábra).



10. ábra: Kromatikus offset kiszámításának folyamatábrája.

Eredmények

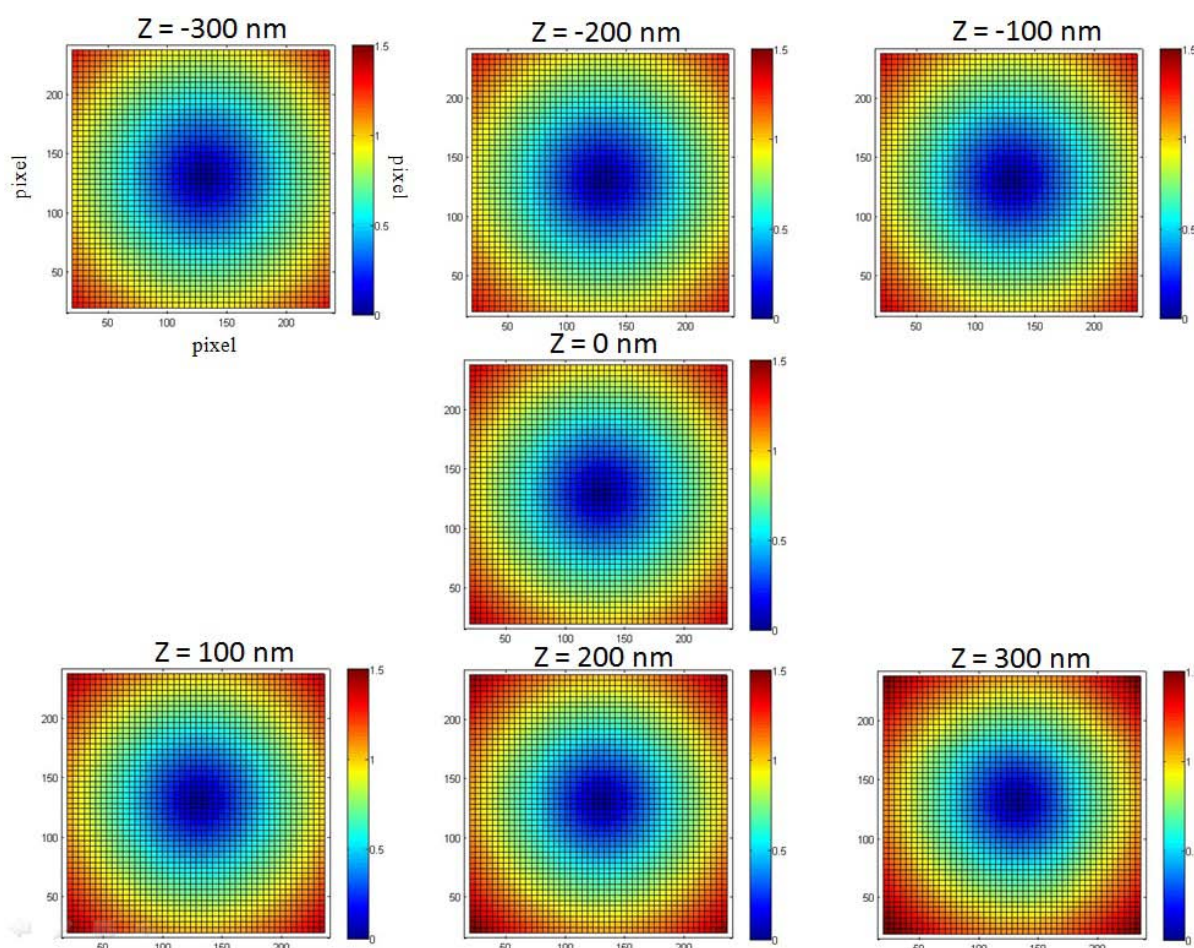
A mikroszkóp objektívek adatait a gyártók nem adják meg, így egy objektív szabadalmát használtam a szimulációkhoz. Ez egy 1,41 numerikus apertúrájú, 100× olajimmerziós Olympus objektív volt [26]. A tubuslencse 180 mm fókusztávolságú tökéletes lencse volt. Mivel a trendek ugyanazok, más objektívet alkalmazva az eredmények nem térnek el szignifikánsan, így ezzel az objektívvel történő szimulációk is alkalmasak az effektus vizsgálatára, intuíciókra. A kromatikus aberráció miatti fókuszeltolódás és PSF torzulás erre az objektívre számolva a 11. ábrán látható.



11 ábra: A vizsgált két hullámhossz tartományra a kromatikus hiba miatti fókuszeltolódás, illetve a képtérben a PSF-ek torzulása, valamint a detektoron megjelenő kép.

A Felhasznált módszerek fejezetben részletezett szisztémát két hullámhossz tartományra és különböző síkokban elhelyezkedő emitter mátrixokra elvégezve egy MATLAB-ban írt programmal ábrázoltam a kromatikus offsetet. Hét síkot választottam ki a Z koordináta mentén -300 nm-től +300 nm-ig 100 nm-es lépésközzel. Ez a tartomány a DOF-ból adódik, ugyanis a fókuszsíktól távolodva a molekulák PSF-jei a képsíkban kiszélesednek, a maximumok értéke leesik, és ~300 nm után válik olyan mértékűvé, hogy az elektronikus zaj miatt már lehetetlen a detektálás.

Az ábrázolt képeken a tengelyek CCD kamera pixel értékkel vannak skálázva, a kromatikus offset értékét a színskála mutatja, értékét szintén CCD kamera pixelértékben adtam meg (12. ábra). Visszavetítve a pixelértékeket a tárgytérbe 1 CCD pixel nagysága 160 nm.

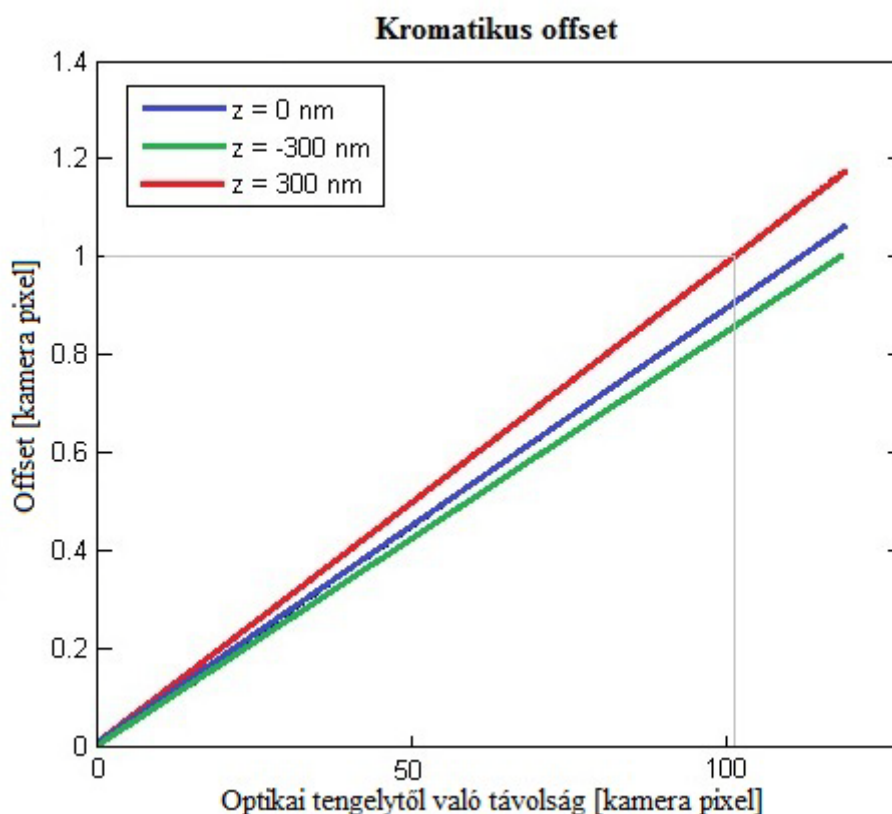


12. ábra Kromatikus offsetek ábrázolása különböző síkokban az optikai tengely mentén (a tengelyek CCD kamera pixel egységeiben).

Az ábrákból jól látszik, hogy a képtér szélén az offset értéke már nagyobb, mint 160 nm. Azt is megállapítottam, hogy az offset értéke nem szimmetrikus a fókuszsíkra. Tehát a

korrekciónál nem csak az számít, hogy a minta milyen távolságra van a fókuszsíktól, hanem ennek a távolságnak az előjele is.

Feltételeztem, hogy a molekulák cirkuláris polarizációval sugároznak, így az offset értékek hengerszimmetrikusak az optikai tengelyre. Lineárisan poláros fény esetén az utóbbi állítás nem mondható el. Az axiális irányban a szimmetria hiányának bemutatására a fenti ábrák közül a $Z = 0$, -300 és $+300$ nm-hez tartozó ábrák keresztmetszeteit (13. ábra).



13. ábra Kromatikus offset értéke a detektor optikai tengelyt átszelő pixelsorára 3 vizsgált síkban cirkulárisan poláros fény esetén.

A grafikonról leolvashatjuk, hogy a $Z = 300$ nm-es síkban az eltolódás az optikai tengelytől mérve ~ 100 kamerapixel távolságra már nagyobb, mint 1 CCD kamera pixel, amit egy 256×256 CCD kamera pixeles képtér esetén már figyelembe kell venni.

Konklúzió

A szimulációk rámutattak, hogy lokalizációs mikroszkópiában a laterális kromatikus aberráció nem elhanyagolható. Megvizsgáltam annak axiális irányú függését és a hiba a fókuszsíkra nézve nem mutat szimmetriát. A számítógépes képalkotásnak köszönhetően azonban, megfelelő algoritmusok alkalmazásával, az effektus korrigálására nyílik lehetőség. Egy ilyen algoritmus elkészítése jövőbeli terveimben szerepel. A továbbiakban a szimulációkat megismétlem tesztmintákra, a biológiában előforduló struktúrákra és megvizsgálom a hiba hatását. Erre alkalmas lesz a TestSTORM szoftver újabb verziója, melynek fejlesztésében magam is részt veszek [27]. Tovább lépést jelent az eredmények kísérleti úton történő megerősítése, illetve egy korrekciós algoritmus tesztelése valós minták esetében. A korrekciós program alkalmazásával jobb minőségű többszínű és térbeli képeket készíthetünk, ami hozzásegíthet a természetben lejátszódó folyamatok megértéséhez.

Függelék 1

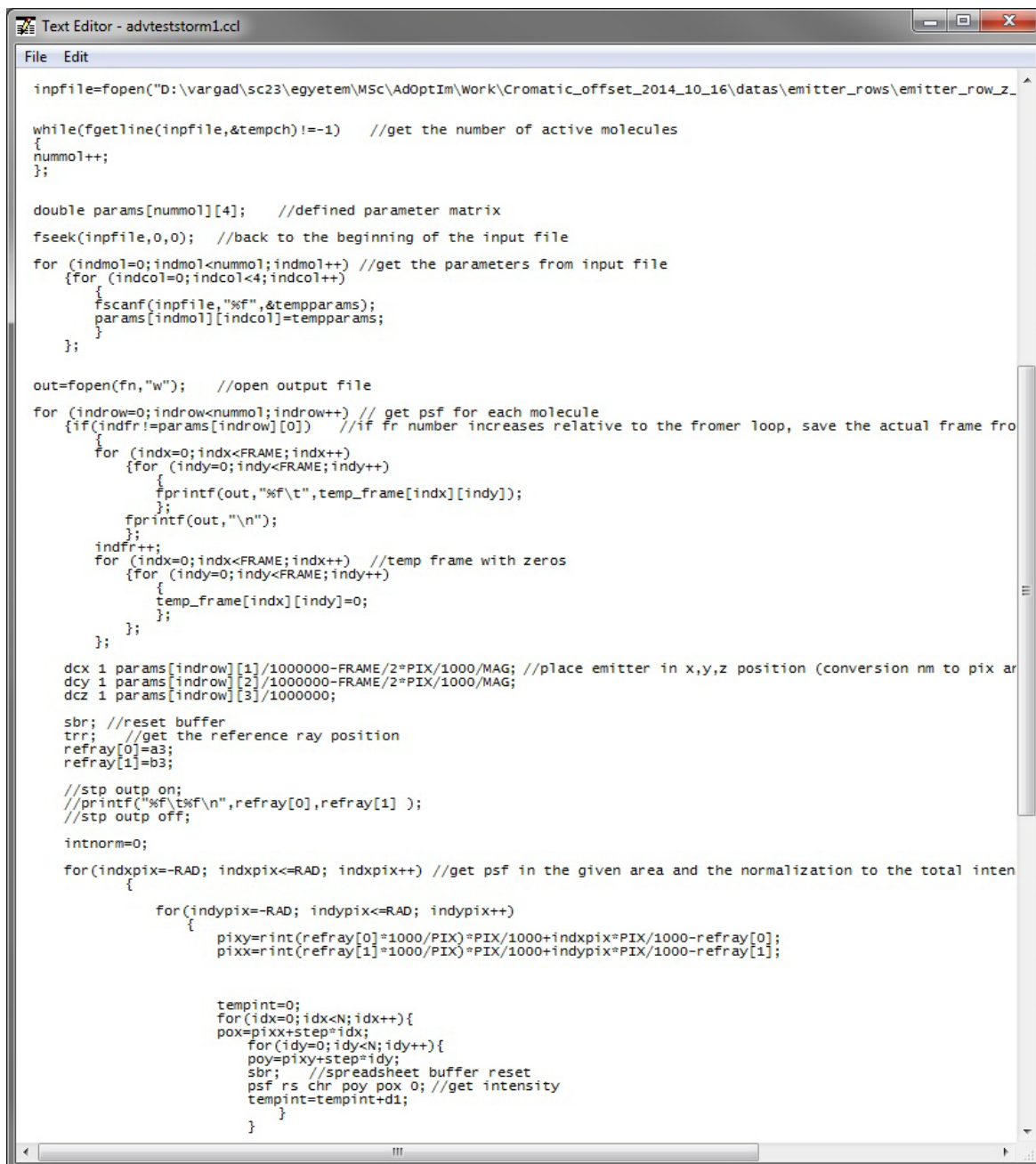
A témavezetőimtől kapott feladatom az volt, hogy szimulációkkal meghatározzam a kromatikus offset nagyságát a tárgypon t térbeli elhelyezkedésének függvényében szuperrezolúciós lokalizációs mikroszkópiában használatos hullámhosszakra.

MATLAB-ot [22] használtam tárgy létrehozásához. OSLO-val [20] a különböző hullámhossztartományokat és tárgytávolságokat beállítva kiszámítottam a létrehozott tárgy képét. A már létező lokalizációs szoftverrel nyert adatfájlokat használva a kromatikus offset értékét MATLAB-ban számítottam ki és az eredményeket szintén ott ábrázoltattam.

Az kutatás jelentősége, hogy az eredmények segítségével korrekciós algoritmusokat lehet készíteni, amelyekkel jobb minőségű képeket hozhatunk létre.

Függelék 2

Az OSLO-nak van karakteres felülete, ami lehetőséget ad programok megírására ccl nyelven. A szimulációim során használt programot mutatom be röviden:

A screenshot of a text editor window titled "Text Editor - advteststorm1.ccl". The window displays CCL code for OSLO. The code starts with opening an input file, then a loop to read parameters for each molecule. It then opens an output file and enters a loop to process each molecule. Inside this loop, it reads the PSF for each molecule, then enters a loop to process each frame. For each frame, it calculates the emitter position, resets the buffer, and then enters a loop to calculate the intensity for each pixel. The code uses various CCL functions like fgetline, fseek, fscanf, and printf. It also includes comments in Hungarian, such as "get the number of active molecules", "back to the beginning of the input file", "get the parameters from input file", "open output file", "get psf for each molecule", "if fr number increases relative to the former loop, save the actual frame from", "temp frame with zeros", "place emitter in x,y,z position (conversion nm to pix ar", "reset buffer", "get the reference ray position", "stp outp on", "stp outp off", "get psf in the given area and the normalization to the total inten", and "spreadsheet buffer reset". The code ends with a loop to calculate the intensity for each pixel.

```
infile=fopen("D:\vargad\sc23\egyetem\MSc\AdOptIm\work\Cromatic_offset_2014_10_16\datas\emitter_rows\emitter_row_z_

while(fgetline(infile,&tempch)!=-1) //get the number of active molecules
{
    nummol++;
};

double params[nummol][4]; //defined parameter matrix
fseek(infile,0,0); //back to the beginning of the input file
for (indmol=0;indmol<nummol;indmol++) //get the parameters from input file
{
    for (indcol=0;indcol<4;indcol++)
    {
        fscanf(infile,"%f",&tempparams);
        params[indmol][indcol]=tempparams;
    }
};

out=fopen(fn,"w"); //open output file
for (indrow=0;indrow<nummol;indrow++) // get psf for each molecule
{
    if(indfr!=params[indrow][0]) //if fr number increases relative to the former loop, save the actual frame fro
    {
        for (indx=0;indx<FRAME;indx++)
        {
            for (indy=0;indy<FRAME;indy++)
            {
                printf(out,"%f\t",temp_frame[indx][indy]);
            }
            fprintf(out,"\n");
        }
        indfr++;
        for (indx=0;indx<FRAME;indx++) //temp frame with zeros
        {
            for (indy=0;indy<FRAME;indy++)
            {
                temp_frame[indx][indy]=0;
            }
        }
    }
};

dcx 1 params[indrow][1]/1000000-FRAME/2*PIX/1000/MAG; //place emitter in x,y,z position (conversion nm to pix ar
dcy 1 params[indrow][2]/1000000-FRAME/2*PIX/1000/MAG;
dcz 1 params[indrow][3]/1000000;

sbr; //reset buffer
trr; //get the reference ray position
refray[0]=a3;
refray[1]=b3;

//stp outp on;
//printf("%f\t%f\n",refray[0],refray[1] );
//stp outp off;

intnorm=0;
for(indxpix=-RAD; indxpix<=RAD; indxpix++) //get psf in the given area and the normalization to the total inten
{
    for(indypix=-RAD; indypix<=RAD; indypix++)
    {
        pixy=rint(refray[0]*1000/PIX)*PIX/1000+indxpix*PIX/1000-refray[0];
        pixx=rint(refray[1]*1000/PIX)*PIX/1000+indypix*PIX/1000-refray[1];

        tempint=0;
        for(idy=0;idy<N;idy++){
            pox=pixx+step*idy;
            for(idy=0;idy<N;idy++){
                poy=pixy+step*idy;
                sbr; //spreadsheet buffer reset
                psf rs chr poy pox 0; //get intensity
                tempint=tempint+d1;
            }
        }
    }
}
```

14. ábra OSLO ccl rutin egy részlete.

Az OSLO kiszámolta a beolvasott DAT fájlban tárolt koordináták, mint fényforrások polikromatikus PSF-jét hullámoptikai megfontolásokat alkalmazva a korábban bemutatott objektívre vonatkozóan. Az emitterek 3 megadott hullámhosszon sugároztak. A program minden emittert egy 5×5 pixeles szegmessel vesz körbe. Minden pixelhez hozzárendel egy relatív intenzitás értéket és ezeket egy adatfájlban tárolja.

Köszönetnyilvánítás

Megköszönöm témavezetőimnek, Dr. Erdélyi Miklósnak és Sinkó Józsefnek, hogy türelemmel és figyelemmel kísérték munkámat, valamint készségesen segítettek a felmerülő nehézségekben. Tapasztalatukat és tudásukat igyekeztek átadni.

Az OSLO optikai tervező programot a Lambda Research Corporation bocsátotta rendelkezésemre.



Referenciák

- [1] E. Abbe, „Beiträge zur theorie des Mikroskops und der mikro-skopischer Wahrnehmung,” Arch. Mikrosk. Anat. **9**(1), 413–418 (1873).
- [2] S. W. Hell, “Far-field optical nanoscopy,” Science **316**(5828), 1153–1158 (2007).
- [3] Sinkó József, Doktori disszertáció, 2014
- [4] S. Hell and E. H. K. Stelzer, "Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope," J. Opt. Soc. Am. A **9**, 2159-2166 (1992)
- [5] S. W. Hell and J. Wichmann, “Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated emission-depletion fluorescence microscopy,” Opt. Lett. **19**(11), 780–782 (1994).
- [6] K. I. Willig, B. Harke, R. Medda, and S. W. Hell, “STED microscopy with continuous wave beams,” Nat. Methods **4**(11), 915–918 (2007).
- [7] T.A. Klar and S.W. Hell, „Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy,” Opt. Lett. **24**, 954–956 (1999).
- [8] M. G. L. Gustafsson: Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy* **198** (2000) 82–87.
- [9] M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang, “Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM),” Nat. Methods **3**(10), 793–796 (2006).
- [10] G. T. Dempsey, J. C. Vaughan, K. H. Chen, M. Bates, and X. Zhuang, “Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging,” Nat. Methods **8**(12), 1027–1036 (2011).
- [11] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, and M. D. Mason, “Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy,” Biophys. J. **91**(11), 4258–4272 (2006).
- [12] T. J. Gould, V. V. Verkhusha, and S. T. Hess, “Imaging biological structures with fluorescence photoactivation localization microscopy,” Nat. Protoc. **4**(3), 291–308 (2009).
- [13] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess, “Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution,” Science **313**(5793), 1642–1645 (2006).
- [14] S. van de Linde, A. Löschberger, T. Klein, M. Heidbreder, S. Wolter, M. Heilemann, and M. Sauer, “Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes,” Nat. Protoc. **6**(7), 991–1009 (2011).

- [15] G. Dempsey, J. Vaughan, K. Chen, M. Bates, X. Zhuang, "Evaluation of Fluorophores for Optimal Performance in Localization-based Super-resolution Imaging", *Nature Methods* **8**, 1027-1036 (2011).
- [16] A. Dani, B. Huang, J. Bergan, C. Dulac, X. Zhuang, "Superresolution imaging of chemical synapses in the brain", *Neuron*, 68, 843-856 (2010).
- [17] M. Born and E. Wolf, *Principles of Optics* (Pergamon Press, New York, 1965)
- [18] <http://www.vision-systems.com/articles/print/volume-17/issue-7/features/leverage-lenses-for-better-vision.html> (2014. november 13.)
- [19] M. Erdelyi, E. Rees, D. Metcalf, G. S. Kaminski Schierle, L. Dudas, J. Sinko, A. E. Knight, and C. F. Kaminski, "Correcting chromatic offset in multicolor super-resolution localization microscopy," *Opt. Express* **21**, 10978-10988 (2013)
- [20] <http://www.lambdare.com/oslo> (2014. november 13.)
- [21] <http://www.andor.com/scientific-cameras/ixon-emccd-camera-series> (2014. november 13.)
- [22] <http://www.mathworks.com/products/matlab/> (2014. november 13.)
- [23] <http://laser.cheng.cam.ac.uk/wiki/index.php/Resources> (2014. november 13.)
- [24] S. Stallinga and B. Rieger, "Accuracy of the Gaussian point spread function model in 2D localization microscopy," *Opt. Express* **18**(24), 24461–24476 (2010)
- [25] Erdélyi Miklós, Sinkó József: Optikai pointillizmus: a lokalizációs optikai mikroszkópia, *Fizikai Szemle*, 2014. május
- [26] M. Mandai and K. Yamaguchi, "Immersion microscope objective lens", US patent US 7,046,451 B2 (2006).
- [27] J. Sinkó, R. Kákonyi, E. Rees, D. Metcalf, A. E. Knight, C. F. Kaminski, G. Szabó, and M. Erdélyi, "TestSTORM: Simulator for optimizing sample labeling and image acquisition in localization based super-resolution microscopy," *Biomed. Opt. Express* **5**, 778-787 (2014).