



Warszawa, 8 lutego 2018

Superrozdzielcze podglądanie reakcji chemicznych

Naukowcy z Instytutu Chemii Fizycznej PAN zademonstrowali, jak za pomocą jednej z superrozdzielczych technik mikroskopowych śledzić reakcje chemiczne przebiegające w bardzo małych objętościach. Opracowana przez warszawskich fizyków metoda analizy jako pierwsza daje potencjalną możliwość obserwowania reakcji zachodzących nie tylko wewnątrz żywych komórek, ale nawet w ich poszczególnych organellach, takich jak jądra komórkowe.

Mechanizmy chemiczne odpowiedzialne za funkcje życiowe komórek wciąż kryją wiele tajemnic. Nie ma w tym nic zaskakującego: dopiero od niedawna dysponujemy narzędziami pozwalającymi bezpośrednio przyglądać się zjawiskom chemicznym zachodzącym w żywych komórkach. Jednak wskutek wciąż istniejących ograniczeń technicznych do dziś nie mamy na przykład tak podstawowej wiedzy jak ta o wartościach stałych równowagi reakcji chemicznych w komórkach. Innymi słowy, wciąż nie wiemy, jaka część substancji chemicznych zaangażowanych w daną reakcję występuje w komórce w formie przereagowanej, a jaka w nieprzereagowanej. Dotychczasowe przeciwności pokonała grupa naukowców z Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk (IChF PAN) w Warszawie. We współpracy z berlińską firmą PicoQuant GmbH opracowała ona i zademonstrowała modyfikację jednej z najnowocześniejszych technik mikroskopowych: superrozdzielczej spektroskopii korelacji fluorescencji.

„Reakcjami chemicznymi w komórkach zajmujemy się od dawna. Na przykład w 2013 roku wyznaczyliśmy współczynniki dyfuzji wszystkich białek w bakterii *Escherichia coli*, dzięki czemu stało się możliwe ustalenie szybkości reakcji przebiegających z ich udziałem. Teraz interesowało nas podobne zagadnienie, tyle że w odniesieniu do sytuacji, gdy mamy małe stężenia reagentów”, mówi prof. dr hab. Robert Hołyst (IChF PAN) i kontynuuje: „Reakcje biologiczne są na ogół odwracalne i tam, gdzie zachodzą, zwykle wytwarza się pewna dynamiczna równowaga między ilością substancji przereagowanych a związkami nieprzereagowanymi. Próbując wyznaczyć stałe równowagi dla różnych reakcji w komórkach sięgnęliśmy po superrozdzielczą spektroskopię korelacji fluorescencji. I tu natknęliśmy się na ciekawy problem techniczny, którego rozwiązanie otworzyło nam nowe możliwości w badaniu chemii życia”.

Istnieje wiele odmian mikroskopii, w tym o rozdzielczościach tak fenomenalnych, że możliwe jest dostrzeżenie pojedynczych atomów. Jednak przy obserwowaniu komórek bezkonkurencyjna pozostaje mikroskopia optyczna, z uwagi na małą inwazyjność i możliwość obrazowania struktury przestrzennej żywych organizmów. Jej podstawową wadą przez długi czas była słaba rozdzielczość: fundamentalne ograniczenia fizyczne (dyfrakcyjne) powodują, że standardowymi technikami optycznymi nie można rozróżnić szczegółów mniejszych od ok. 200 nanometrów.

Jedną z odmian mikroskopii optycznej jest mikroskopia fluorescencyjna. Polega ona na wprowadzeniu barwnika fluorescencyjnego w badane miejsca próbki biologicznej, a następnie skanowaniu próbki zogniskowaną wiązką lasera. Cząsteczki barwnika znajdujące się w ognisku zostają pobudzone do świecenia. Przepuszczając wyemitowane przez nie światło przez specjalny otwór (konfokalny) można otrzymać obrazy o podwyższonej rozdzielczości. W 1994 roku Stefan W. Hell zaprezentował sposób przekroczenia limitu dyfrakcyjnego w mikroskopii fluorescencyjnej za pomocą wygaszania emisją wymuszoną (STimulated Emission Depletion, STED). STED wymaga dodatkowej wiązki laserowej, przypominającej w przekroju bajgla, czyli pęczek z dziurką. Odpowiednio użyta, wiązka ta wygasza zewnętrzne obszary ogniska głównej wiązki laserowej i w konsekwencji redukuje jego rozmiary do wartości mniejszych od limitu dyfrakcyjnego. Metodami superrozdzielczymi można dziś dostrzec detale przestrzenne o rozmiarach zaledwie 10 nm przy rozdzielczości czasowej sięgającej mikrosekund.

Stosunkowo młodą gałęzią mikroskopii optycznej jest mikroskopia konfokalna z korelacją fluorescencji (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS). W odmianach superrozdzielczych ognisko lasera ma tu objętość liczoną w dziesiątkach attolitrów (jeden attolitr to miliardowa część jednej miliardowej litra). Pomiar polega na mierzeniu światła emitowanego przez barwnik fluorescencyjny doczepiony do badanej cząsteczki, wzbudzony przez wiązkę laserową. Znając rozmiary ogniska i czas trwania fluorescencji oraz wspomagając się odpowiednimi modelami teoretycznymi, można tu dość precyzyjnie ustalić prędkość ruchu nawet pojedynczych cząsteczek.

„Od pewnego czasu było wiadomo, że o ile superrozdzielcza mikroskopia FCS sprawdza się przy obserwowaniu cząsteczek poruszających się w dwóch wymiarach, np. w membranach lipidowych, o tyle zawodzi przy obserwacjach w pewnej objętości. Czasy dyfuzji, wyznaczone na podstawie pomiarów w 3D, potrafiły się różnić od przewidywań z pomiarów w 2D o rząd wielkości, a nawet więcej. Po kilku miesiącach badań stało się dla nas jasne, że za te rozbieżności odpowiada zbyt uproszczony sposób wyznaczania przestrzennych rozmiarów ogniska”, mówi dr Krzysztof Sozański (IChF PAN).

Na podstawie własnych analiz teoretycznych oraz doświadczeń warszawscy naukowcy, finansowani z grantów MAESTRO Narodowego Centrum Nauki i ERA Chairs europejskiego programu Horizon 2020, skonstruowali nowy, uniwersalny model teoretyczny, wprowadzający korektę przestrzennego kształtu ogniska i uwzględniający jej wpływ na zmierzony stosunek sygnału do szumu. Poprawność modelu początkowo zweryfikowano w pomiarach szybkości dyfuzji różnych fluoryzujących próbników w roztworach.

„Wykonaliśmy też bardziej zaawansowane eksperymenty. Badaliśmy na przykład odwracalną reakcję, w której cząsteczki barwnika przyczepiały się do micel, a po pewnym czasie się odczepiały. Układ zbudowany ze stosunkowo dużych kulek z cząsteczek surfaktantów reagujących z cząsteczkami barwnika odwzorowywał warunki charakterystyczne dla obiektów biologicznych”, mówi doktorant Xuzhu Zhang (IChF PAN). Pomiar nie był trywialny. Gdyby cząsteczki obu reagentów poruszały się wolno, podczas przechodzenia przez ognisko barwnik mógłby wielokrotnie się łączyć/odłączać z/od micel i emitowane światło byłoby uśrednione. Ale mógł też zajść wariant skrajnie inny: reakcje przyłączania i odłączania przebiegające tak wolno, że w trakcie przejścia przez ognisko nie dochodziłoby do zmian relacji między reagentami – wtedy uśredniania by nie było. „Nasz model uwzględnia nie tylko oba przypadki skrajne, ale także wszystkie pośrednie. A dysponując wiedzą o rzeczywistych rozmiarach ogniska jesteśmy w stanie zmieniać jego wielkość i w tym samym układzie chemicznym i na tym samym sprzęcie przebadać eksperymentalnie wszystkie przypadki wymagane przez model”, podkreśla Zhang.

Ważną cechą metody analitycznej opracowanej w IChF PAN jest fakt, że do jej stosowania nie są potrzebne zmiany w aparaturze. Po odpowiedniej adaptacji metoda może być użyta w celu dokładniejszego interpretowania danych zarejestrowanych przez już wyprodukowane mikroskopy korzystające z techniki STED.

Informacja prasowa zrealizowana ze środków europejskiego grantu ERA Chairs w ramach programu Horizon 2020.

Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk (<http://www.ichf.edu.pl/>) został powołany w 1955 roku jako jeden z pierwszych instytutów chemicznych PAN. Profil naukowy Instytutu jest silnie powiązany z najnowszymi światowymi kierunkami rozwoju chemii fizycznej i fizyki chemicznej. Badania naukowe są prowadzone w dziewięciu zakładach naukowych. Działający w ramach Instytutu Zakład Doświadczalny CHEMIPAN wdraża, produkuje i komercjalizuje specjalistyczne związki chemiczne do zastosowań m.in. w rolnictwie i farmacji. Instytut publikuje około 200 oryginalnych prac badawczych rocznie.

KONTAKT:

dr **Krzysztof Sozański**
Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie
tel.: +48 22 3433127
email: ksozanski@ichf.edu.pl

PUBLIKACJE NAUKOWE:

1. „Nanoscopic Approach to Quantification of Equilibrium and Rate Constants of Complex Formation at Single-Molecule Level”
X. Zhang, E. Sisamakias, K. Sozański, R. Hołyst
Journal of Physical Chemistry Letters 2017, 8, 5785-5791
DOI: 10.1021/acs.jpcllett.7b02742
2. „Quantitative fluorescence correlation spectroscopy in three-dimensional systems under stimulated emission depletion conditions”
K. Sozański, E. Sisamakias, X. Zhang, R. Hołyst
Optica, vol. 4, no. 8, August 2017
DOI: 10.1364/OPTICA.4.000982

POWIĄZANE STRONY WWW:

<http://www.ichf.edu.pl/>
Strona Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk.

<http://www.ichf.edu.pl/press/>
Serwis prasowy Instytutu Chemii Fizycznej PAN.

<http://www.ichfdlafirm.pl/>
Oferta Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk skierowana do przedsiębiorców i przemysłu.

MATERIAŁY GRAFICZNE:

ICHF180208b_fot01s.jpg

HR: http://ichf.edu.pl/press/2018/02/ICHF180208b_fot01.jpg

W Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie pokazano, jak za pomocą superrozdzielczej mikroskopii korelacji fluorescencji śledzić przebieg reakcji chemicznych w niezwykle małych objętościach, porównywalnych z rozmiarami jąder komórkowych. Na zdjęciu doktorant Xuzhu Zhang w laboratorium. (Źródło: IChF PAN, Grzegorz Krzyżewski)

ICHF180208b_fot02s.jpg

HR: http://ichf.edu.pl/press/2018/02/ICHF180208b_fot02.jpg

Nowa metoda analizy obrazów z superrozdzielczej mikroskopii korelacji fluorescencji została zweryfikowana m.in. w eksperymentach odwzorowujących środowisko biologiczne. Naukowcy obserwowali małe cząsteczki barwnika fluorescencyjnego, przyłączające się i odłączające do/od stosunkowo dużych, kulistych micel. (Źródło: IChF PAN, Grzegorz Krzyżewski)