

## Lubelski Oddział Polskiego Towarzystwa Biofizycznego

zaprasza na wykład:

### Jak poprawić rozdzielczość w mikroskopii konfokalnej i dwufotonowej używając korelacji światła fluorescencji?

który wygłosi: **dr Radek Łapkiewicz**

**Instytut Fizyki Doświadczalnej, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski**

**Wykład odbędzie się 2 grudnia 2022 r. o godzinie 13:15**

**w Sali A-341, Instytutu Fizyki, UMCS, pl. M. Curie-Skłodowskiej 1**

#### STRESZCZENIE

Ograniczenie dyfrakcyjne stanowi jeden z głównych problemów fluorescencyjnego obrazowania biologicznego. Metody mikroskopii nadrozdzielczej takie jak STED czy STORM pozwalają osiągnąć rozdzielczość przestrzenną rzędu 10nm, ale wymagają skomplikowanych układów doświadczalnych lub długich pomiarów. Prawdopodobnie dlatego mikroskopia konfokalna nadal pozostaje dominującą techniką trójwymiarowego obrazowania biologicznego. Okazuje się jednak, że niewielka modyfikacja mikroskopu konfokalnego pozwala złamać ograniczenie dyfrakcyjne dzięki technice skanowania obrazem (ang. Image Scanning Microscopy; ISM). Technika ta wymaga zastąpienia fotonowielacza macierzą detektorów pojedynczych fotonów (Single Photon Avalanche Diode array; SPAD array). Macierz (kamera) SPAD zainstalowana w mikroskopie umożliwia nie tylko poprawę rozdzielczości dzięki wykorzystaniu informacji przestrzennej, jak w przypadku ISM, ale także liczenie fotonów z subnanosekundową rozdzielczością czasową. Przy zastosowaniu laserów pikosekundowych, zarejestrowane przebiegi czasowe pozwalają zmierzyć czas życia fluoroforów a także zarejestrować korelacje światła fluorescencji.

W pracy [1] zademonstrowaliśmy, że kwantowe korelacje światła fluorescencji pozwalają poprawić rozdzielczość techniki ISM w trzech wymiarach, a następnie pokazaliśmy [2], że klasyczne korelacje prowadzą do lepszego stosunku sygnału do szumu i, co za tym idzie, krótszych pomiarów. Co ciekawe, wprowadzone przez nas techniki oparte na korelacjach, Q-ISM i SOFISM, nie wymagają specjalnego przygotowania próbek, ponieważ światło emitowane przez większość fluoroforów używanych w mikroskopii jest skorelowane [3]. Głównym ograniczeniem naszych technik jest blaknięcie fluoroforów, które ogranicza możliwości obrazowania 3D.

Mikroskopia dwufotonowa w naturalny sposób prowadzi do redukcji blaknięcia fluoroforów a także, dzięki słabszemu rozpraszaniu światła o większej długości fali, umożliwia obrazowanie głęboko w tkance. W drugiej części prezentacji przedstawię nasze postępy w pracy nad mikroskopią dwufotonową z wykorzystaniem światłowodowych laserów femtosekundowych. Dla zastosowań w obrazowaniu żywych organizmów, gdzie kluczowa jest rozdzielczość czasowa, wprowadzamy proste modyfikacje optyczne, które pozwalają znacząco przyspieszyć pomiary. Wzbudzenie fluorescencji wiązką Bessela, pozwala na zastąpienie skanów trójwymiarowych, skanami dwuwymiarowymi, a ogniskowanie czasowe umożliwia obrazowanie dwufotonowe w szerokim polu, co pozwala ograniczyć skan tylko do jednego wymiaru. Tak jak w przypadku mikroskopii jednofotonowej, kiedy szybkość pomiaru nie jest krytyczna, staramy się poprawić rozdzielczość obrazowania przez pomiary korelacji czasowych.

#### Literatura:

[1] R. Tenne, et al., Super-resolution enhancement by quantum image scanning microscopy, *Nat. Phot.*, 13, 116 (2019)

[2] A. Sroda, et al., SOFISM: Super-resolution optical fluctuation image scanning microscopy, *Optica* 7, 1308-1316 (2020)

[3] M. Pawłowska, et al., Embracing the uncertainty: the evolution of SOFI into a diverse family of fluctuation-based super-resolution microscopy, *J. Phys. Phot.* 4 012002 (2022)

