

Þróun nýrrar örflögutækni fyrir smásjárskoðun lífrænna sýna

Björn Agnarsson^a, Jennifer Halldorsson^a, Nina Björk Arnfinnsdóttir^a, Sævar Ingþórsson^b,
Þórarinn Guðjónsson^b og Kristján Leósson^a

^aRaunvísindastofnun Háskólans og ^bLífvísindasetur Læknagarðs

Vefútgáfa: 19. nóvember 2008

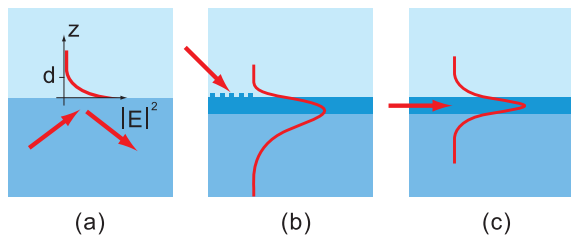
Ágrip – Lýst er nýrri aðferð, til að örva flúrljómun í lífrænum sýnum, sem byggir á notkun bylgjuleiðara. Örvunarljósið er bundið í þunnu ljósleiðandi lagi við yfirborð örflögu. Kápu ljósleiðarans mynda sýnið í vatnslausn á annan veginn og plastefni með brotstuðul áþekkan vatni á hinn. Þetta gefur samhverfan bundinn sveifluhátt í bylgjuleiðaranum sem dvínar samkvæmt vísisfalli frá yfirborði flögunnar og inn í sýnið. Seilingu ljóssins má stilla með vali á þykkt og brotstuðli bylgjuleiðarans. Aðferðin hentar vel til rannsókna á yfirborðsbindingu ljósvirkra efna, efnaflutningi yfir frumuhimnur, víxlverkun fruma við yfirborð, o.fl.

1. Inngangur

Flúrljómunarsmásjár eru meðal mikilvægustu rannsóknatækja í vefjafræði, frumulíffræði, sameindalíffræði og skyldum greinum. Auk hefðbundinna aðferða til smásjárskoðunar á flúrljómandi sýnum hafa margar sérhæfðari aðferðir verið þróaðar sem henta betur afmörkuðum viðfangsefnum [1]. Ein slík aðferð var kynnt upp úr 1990 og byggir á alspeglun ljóss (e. Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy) á skilfleti smásjarglers og sýnis [2], sbr. mynd 1(a), en sýnið er í flestum tilfellum í vatnslausn. Með þessari aðferð má takmarka örvun flúrljómandi efna í sýninu við örþunnt lag (<100 nm) við yfirborð smásjarglersins. Nú til dags eru staðlaðar TIRF smásjár framleiddar af öllum helstu smásjárframeiðendum. Í flestum tilvikum eru þær byggðar þannig að smásjár linsu er komið fyrir undir þunnu smásjargleri með olíu á milli til að stækka mögulegt innfallshorn örvunarljóss í smásjarglerinu yfir markhorn alspeglunar. Dæmigert gildi á söfnunarkeilu (e. numerical aperture, NA) fyrir slíka linsu er 1.45. Þessi tækni gefur mun skarpari myndir af flúrljómun við yfirborðið en hefðbundin flúrljómunarsmásjá því ekkert merki er örvað utan fókuspans linsunnar, eins og tilfellið er í hefðbundinni smásjá þar sem örvunarljósið lýsir í gegnum allt sýnið. Aðferðin nýtist því einnig til

að mæla mun veikari merki en ella, m.a. frá einstökum sameindum [2].

Flúrljómun má einnig takmarka við yfirborð með því að nýta eiginleika bylgjuleiðara. Bylgjuleiðari er myndaður af kjarna sem er umlukinn kápu. Kjarninn hefur hærri brotstuðul en kápan. Hefðbundnir ljósleiðaraþræðir sem notaðir eru t.d. í samskiptatækni eru sívalningssamhverfir og gerðir úr tveimur efnum en einnig má mynda plan-ljósleiðara úr þremur lögum efna — neðri kápu, kjarna og efri kápu — og hefur kjarninn þar hæsta brotstuðulinn en efri og neðri kápa geta haft ólíkan brotstuðul. Í einföldum þriggja laga bylgjuleiðara ferðast ljósið í plani ljósleiðarans eins og um frjálsa bylgju væri að ræða en er bundið hornrétt á planið. Með því að nota sýni, t.d. í vatnslausn, sem efri kápu, fæst ljósstyrkur sem dvínar samkvæmt vísisfalli inn í sýnið, svipað og við alspeglun. Seiling rafsviðsins inn í sýnið er m.a. háð brotstuðli laganna og þykkt kjarnans. Dæmi eru um að þunnt lag af $\text{Si}_x\text{Ti}_{1-x}\text{O}_2$ á glerundirlagi hafi verið notað til að leiða ljós og örva flúrljómun í frumum fyrir smásjárskoðun [3]. Sveifluháttur örvunarljóssins er í þessu tilfelli mjög ósamhverfur vegna þess hve miklu munar á brotstuðli glers ($n=1.5$) og vatns ($n=1.33$), eins og sýnt er á mynd 1(b). Seiling ljóssins inn í sýnið getur í þessu tilfelli verið 100–200 nm. Til að örva sveifluháttinn er ljós látið falla undir ákveðnu horni á ljós-



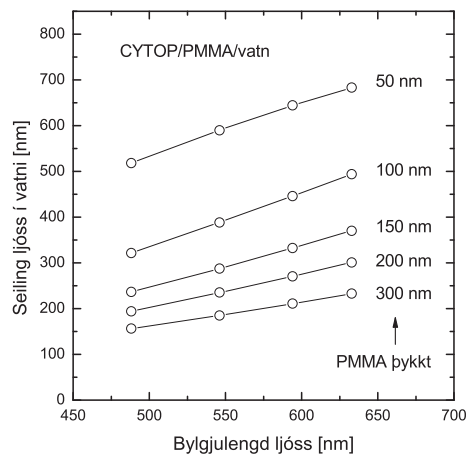
Mynd 1. Yfirborðsbundna ljósörvun í lífrænum sýnum í vatnslausn má fá fram með (a) alspeglun ljóss á skilfletiglers og sýnis, (b) ljósi bundnu í ósamhverfum bylgjuleiðara sem kúplað er inn með ljósgreiðu á yfirborði bylgjuleiðarans eða (c) ljósi bundnu í samhverfum bylgjuleiðara þar sem kúpla má ljósinu beint inn í enda bylgjuleiðarans.

greiðu sem prentuð er í yfirborð ljósleiðarans og er innfallshornið háð bylgjulengd ljóssins. Aðferðin gerir miklar kröfur til gæða ljósgreiðunnar og erfitt er að tryggja jafna lýsingu yfirborðsins [3]. Þessi tækni hefur því ekki reynst raunhæfur möguleiki fyrir smásjárskoðun.

Hér verður lýst nýrri aðferð við að örva flúrljómun með samhverfum bylgjuleiðara, þ.e.a.s. þar sem brotstuðull sýnis og neðri kápu er nokkurn veginn sá sami, sbr. mynd 1(c). Þessi gerð bylgjuleiðara hefur marga kosti framyfir ósamhverfa bylgjuleiðara, m.a. að hægt er að örva sveifluháttinn með því að senda ljós úr hefðbundnum ljósleiðara beint inn í bylgjuleiðarann. Þetta einfaldar uppsetningu, eykur myndgæði með jafnari lýsingu og leyfir margar bylgjulengdir samtímis án þess að breyta þurfi innfallshorni. Einnig má stilla seilingu ljóssins yfir mun breiðara svið (100–1000 nm) en mögulegt er með öðrum aðferðum. Þessa aðferð má nota með hvaða ljóssmásjá sem er og notandinn hefur fullt val um hvaða smásjárhlinsur eru notaðar til að safna flúrljómunarmerkini. Í smásjármyndatöku getur aðferðin gefið samfellda lýsingu og mikla næmni sem m.a. er mikilvægt þegar taka á myndir af hröðum atburðum í lifandi frumum.

2. Útreikningar á seilingu ljóss

Aðeins örfá efni hafa brotstuðul nálægt brotstuðli vatns. Eitt þeirra er plastefnið CYTOP (perfluoropolybutenyl-vinyl-ether, Asahi Glass Co.) með brotstuðulinn 1.34. CYTOP er uppleysanlegt og hefur lágt ljósisog á breiðu bylgjulengdarsviði. Við völdum að nota PMMA (polymethylmethacrylate,



Mynd 2. Reiknuð seilingarfjarlægð ljóss fyrir PMMA ljósleiðarakjarna með mismunandi þykkt inn í vatnslausn sem myndar efri kápu ljósleiðarans. Staðsetning punktanna svarar til algengra örvunarbylgjulengda fyrir flúrljómami efni.

MicroChem Corp.) í kjarna ljósleiðarans. PMMA hefur brotstuðulinn $n=1.49$ og litla sjálf-flúrljómun (e. autofluorescence) [4].

Seilingu bundins sveifluháttar í ljósleiðara inn í kápu (sýni) má reikna með eftirfarandi jöfnu [5] þar sem d er skilgreint sem fjarlægðin þar sem útslag rafsviðsins hefur náð $1/e$ af gildi sínu við skilin milli kjarna og kápu. Ljósstyrkur í sýninu hefur því dvínad í $1/e^2 \approx 13.5\%$ í fjarlægðinni $z = d$ frá yfirborði kjarna ljósleiðarans.

$$d = \frac{\lambda}{2\pi} \frac{1}{\sqrt{n_{\text{eff}}^2 - n_s^2}}. \quad (1)$$

λ er bylgjulengd örvunarljóssins, n_s er brotstuðull sýnisins en n_{eff} er virkur brotstuðull sveifluháttarinnar sem fundinn er með því að leysa jöfnur Maxwells með þeim jaðarskilyrðum sem lagskipting efnanna setur. Hér verður aðeins fjallað um einháttu bylgjuleiðara, þ.e. tilfelli þar sem kjarni bylgjuleiðarans er nægilega þunnur til að aðeins ein bundin lausn sé til fyrir hvora skautunarstefnu ljóssins. Mynd 2 sýnir niðurstöður útreikninga fyrir mismunandi þykktir á kjarna ljósleiðarans. Tekið var tillit til breytinga í brotstuðli CYTOP, PMMA og vatns með bylgjulengd. Myndin sýnir aðeins niðurstöður fyrir p-skautað ljós (rafsviðsvigur hornréttur á plan ljósleiðarans) en sú skautun gefur sterkara flúrljómunarmerki en s-skautað ljós [6]. Með PMMA bylgjuleiðarakjarna má því fá seilingu ljóss

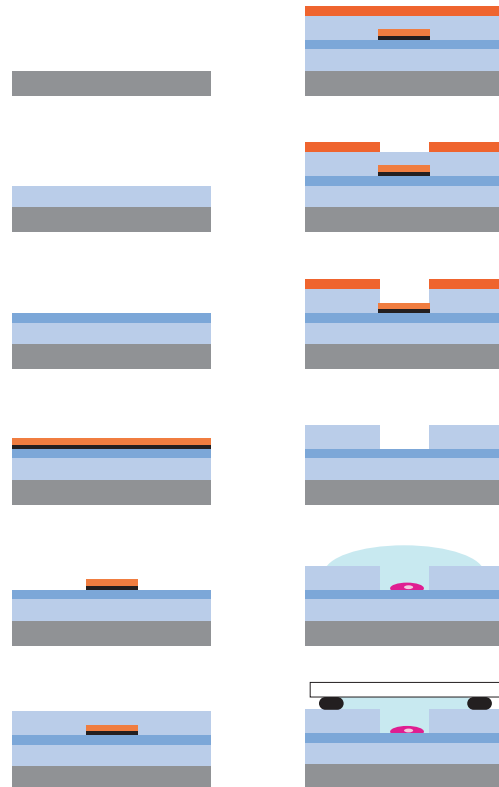
inn í vatnslausn á bilinu 150–500 nm fyrir blátt ljós og 200–700 nm fyrir rautt ljós.

Raunveruleg sýni geta haft brotstuðul sem er frábrugðinn vatni og oft er brotstuðullinn breytilegur eftir staðsetningu innan sýnis. Lifandi frumur hafa brotstuðul á bilinu 1.33–1.39 [7]. Örvunarljósið getur því náð allt að 20% lengra inn í frumuna en mynd 2 gefur til kynna fyrir mestu þykkt á PMMA og er jafnvel óbundið fyrir þynnstu PMMA lögin. Dreifing (e. scattering) á örvunarljósinu út úr bylgjuleiðaranum getur átt sér stað ef snöggar breytingar verða á brotstuðli í sýninu, sérstaklega ef seilingarfjarlægð er stór, og getur það valdið ójafnri lýsingu. Mikilvægt er því að þekkja brotstuðul sýnisins til að velja megi rétta þykkt á ljósleiðarann og meta raunverulega seilingarfjarlægð ljóssins inn í sýnið.

3. Framleiðsluferli og undirbúningur sýna

Ljósleiðandi örflögur voru framleiddar á eftirfarandi hátt (sjá einnig mynd 3). Kísil- eða glerskífur voru hitaðar til að fjarlægja vatn af yfirborði og meðhöndlaðar með AP3000 viðloðunarefni (DOW Chemical Company). Skífurnar voru húðaðar með uppleystu CYTOP CTX-809AP2 á snúningsplötu (e. spinner) sem gefur um 4 μm þykkt lag. Skífurnar voru hitaðar í ofni við 180°C til að baka burt leysiefni og bæta viðloðun við undirlagið. Mikilvægt er að baka skífurnar undir hjálmi til að minnka hættu á rykmengun og hægja á uppgufun leysiefna sem gefur hreinna og sléttara yfirborð. Ómeðhöndlað CYTOP yfirborð hrindir frá sér vökva (snertihorn um 110°) þ.a. nauðsynlegt er að meðhöndla það til að lækka snertihorn við þá lausn sem myndar kjarna ljósleiðarans (PMMA í þessu tilfelli). Ef þunnu lagi af áli er húðað á yfirborðið í lofttæmi snúast karboxýl-endahópar fjölliðanna að yfirborðinu og bindast álinu. Ef álið er síðan fjarlægt með votætingu verður breyting á snertihorni yfirborðsins (í u.þ.b. 80°) og viðloðun milli CYTOP og PMMA eykst.

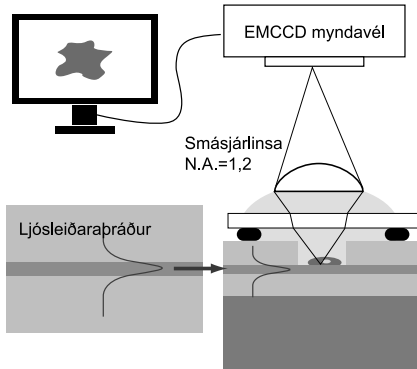
PMMA uppleyst í anísól var notað til að leggja 450 nm þykkjan kjarna ljósleiðarans ofan á CYTOP lagið eftir meðhöndlun með áli. Til að vernda PMMA lagið frá leysiefnum var skífan aftur húðuð með áli (200 nm á þykkt) og því næst var álið húðað með lagi af ljósnæmu efni fyrir rásaprentun (um 1 μm á þykkt). Mynstur var prentað í ljósnæma lagið til að skilgreina stöðvunarlag fyrir seinna ætingarskref. Mynstrið var framkallað í NaOH lausn sem ætir einnig álið á þeim



Mynd 3. Framleiðsluferli fyrir ljósleiðandi örflögur. Þriggja laga plan-ljósleiðari er lagður á yfirborð kísil- eða glerskífu og með ætingu er hluti efsta lagsins fjarlægður til að mynda brunn niður að yfirborði kjarnans. Sýni í vatnslausn er komið fyrir í brunninum og honum lokað með þekjugleri. Nánari skýringar í texta.

stöðum þar sem ljósnæma efnið hefur verið fjarlægt. Efri kápa var mynduð með því að húða öðru 4 μm CYTOP lagi á yfirborðið og var það lag einnig bakad í ofni og meðhöndlað til að lækka snertihorn. Nýtt ljósnæmt lag var lagt á yfirborðið og prentað í það mynstur fyrir ætingu á brunnnum gegnum efri kápana. Stærð brunnanna var 2×2 mm. CYTOP æting var framkvæmd í rafgasi með O₂:CHF₃ gasblöndu. Eftir ætingu var skífan söguð niður í 10×10 mm² flögur og leifar af ljósnæmu efni og áli voru fjarlægðar rétt áður en flögum var komið fyrir í frumuræktun.

Brjóstakrabbameinsfrumulínan MCF7 var ræktuð á örflögum í DMEM/F12 frumuæti með 5% kálfasermi. Frumurnar voru ræktaðar í tvo daga eða þar til þær mynduðu klasa með 5–10 frumum. Að lokinni ræktun voru frumurnar fixeraðar í 3.5% formalíni

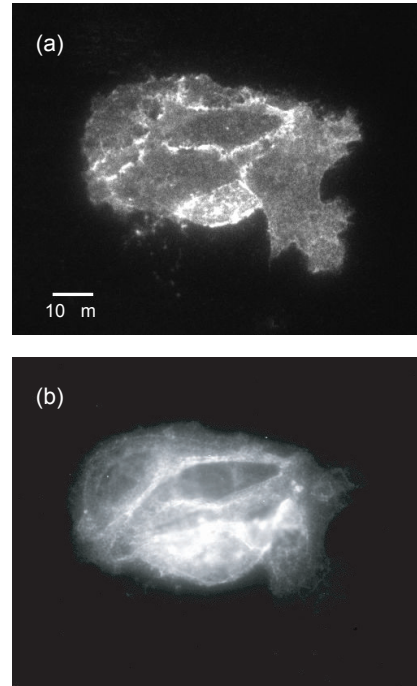


Mynd 4. Einfölduð mynd af tilraunauppstillingu.

og gerðar gegndreypar með Triton-X-100 sápu og undirbúnar fyrir mótefnalitun. Til þess að koma í veg fyrir ósértæka bindingu mótefnis við önnur prótein voru frumurnar blokkeraðar með 10% sermi/PBS (e. phosphate buffer saline). Notað var mótefni fyrir viðloðunarpróteinið E-cadherin sem bindur saman himnur aðliggjandi fruma. Sem flúrljómandi yfirbygging (e. secondary antibody) var notað Alexa Fluor 546. Ræktunarbunnarnir á örflögunum voru fylltir með vatni og lokað með þekjugleri. Glerið var lagt á þéttihring úr tveggja þátta PDMS sílíkoni (Sylgard 184, Dow Corning) sem blandað var með svörtu prentdufti til að draga úr bakgrunnsljósi.

4. Niðurstöður

Smásjármyndir af frumum voru fengnar með því að senda ljós frá hvítum ljósgjafa (SuperK Versa, Koheras A/S) gegnum breytilega síu sem stillt var til að hleypa í gegn ljósi við 551 nm með 3.5 nm bandbreidd. Ljósið fór gegnum $\lambda/2$ -plötu sem var snúið til að velja skautun ljóssins og kúplað inn í einháttu ljósleiðarabráð sem varðveitir skautunina. Hinn endi ljósleiðarans var stilltur af miðað við bylgjuleiðara flögunnar eins og sýnt er á mynd 4. Ljósið ferðast um 4 mm frá kanti flögunnar þar til það kemur að brunninum þar sem það örvar flúrljómandi efni við yfirborðið. Flúrljómuninni var safnað með smásjárhlinsu sem gerð er til að taka myndir gegnum þekjugler í vatni (Zeiss C-Apochromat 63 \times , NA=1.2) og stafræn myndavél með straummögnun (e. electron multiplying CCD camera) var notuð til myndatöku. Örvunarljósið var síað frá með lituðu gleri sem hleypir í gegn ljósi með bylgjulengd yfir 570 nm. Fræðileg greinigæði linsunnar eru um 300 nm við 570 nm



Mynd 5. Samanburður á smásjármyndum af frumuklasa. (a) Mynd tekin með yfirborðslýsingu frá bylgjuleiðara. (b) Mynd tekin með hefðbundinni flúrljómunarsmásjá þar sem örvunarljósið fer í gegnum allt sýnið.

bylgjulengd og punktastærð myndavélarinnar svarar til 200 nm í myndfletinum.

Mynd 5(a) sýnir smásjármynd sem tekin er með þeim búnaði sem lýst er að ofan. Örvunarljósið nær tæplega 200 nm inn í frumuklasann. Til samanburðar er mynd 5(b) tekin með hefðbundinni flúrljómunarsmásjá þar sem örvunarljósið ferðast í gegnum allt sýnið (Nikon Eclipse E800 smásjá, 100 \times , NA=1.3 olúfúlinsa, Nikon DXM1200F myndavél). Eins og sjá má er mikill munur á aðferðunum tveimur, í fyrra tilfellinu eru útlínur frumuklasans mjög skýrar og flúrljómunarkerki frá frumuhimnum sem liggja við yfirborðið sést greinilega. Í seinna tilfellinu er merki úr bol frumuklasans yfirgnæfandi. Eins og við er að búast er merkið sterkast þar sem frumur mætast og þéttleiki E-cadherin próteina er mestur.

5. Lokaorð

Við höfum kynnt nýja aðferð sem nýta má í tilraunum í lífvísindum þar sem skoða þarf virkni efna við yfirborð, t.d. í og við frumuhimnur. Aðferðin gæti

nýst sérlega vel fyrir tilraunir á lifandi frumum því lýsing yfirborðsins er samfelld (ólíkt t.d. „confocal“ smásjám) og örvunarlýsingin er með öllu óháð þeim búnaði sem notaður er til að safna flúrljómuninni og mynda hana. Tilraunirnar má því framkvæma nánast á hvaða ljóssmásjá sem er og krefjast ekki sérbyggðrar flúrljómunarsmásjár.

Á eðlisfræðistofu Raunvísindastofnunar hefur verið sett upp smásjá fyrir mælingar af þessu tagi með framúrskarandi góðri smásjárllinsu fyrir myndatöku í vatnslausn. Velja má örvunarbylgjulengd hvar sem er á sýnilega sviðinu og mæla flúrljómun með mun meiri næmni en venjulegar stafrænar myndavélar bjóða upp á. Þetta kerfi getur því nýst í ýmsar tilraunir, m.a. til myndatöku á hröðum atburðum í lifandi frumum eða á mjög veikum ljósmerkjum. Að auki býður ljósrásatæknin upp á marga ókannaða möguleika í stýringu ljóss á flöggunni auk annarrar hagnýtingar þar sem yfirborðsbundið ljós getur komið að gagni. Greinarhöfundar munu einbeita sér að því á komandi árum að kanna þessa möguleika frekar.

Kesara Anamthawat-Jónsson og Sæmundur Sveinsson á Líffræðistofnun fá þakkir fyrir aðstoð við flúrljómunarmælingar. Verkefnið er styrk af markáætlun Vísinda- og tækniráðs um erfðir og örtækni, Rannsóknasjóði Háskóla Íslands og Umhverfis- og orkurannsóknasjóði Orkuveitu Reykjavíkur.

Heimildir

- [1] Sjá t.d. yfirlitsgreinar um flúrljómun í *Nature Methods* **2**(12) (2005).
- [2] D. Axelrod, E.H. Hellen, R.M. Fulbright, Total internal reflection fluorescence. Í *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Volume 3: Biochemical Applications* (J.R. Lakowicz, ritstj.), 289-343 (Plenum Press, New York, 1992).
- [3] H.M. Grandin, B. Städler, M. Textor, J. Vörös, Waveguide excitation fluorescence microscopy: A new tool for sensing and imaging the biointerface. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 1476 (2006).
- [4] H. Shadpour, H. Musyimi, J. Chen, S.A. Soper, Physicochemical properties of various polymer substrates and their effects on microchip electrophoresis performance. *J. Chromatogr. A* **1111**, 238 (2006).
- [5] K. Kawano, T. Kitoh, *Optical waveguide analysis* (Wiley, Chichester, 2001).
- [6] R. Bernini, N. Cennamo, A. Minardo, L. Zeni, Planar Waveguides for Fluorescence-Based Biosensing: Optimization and Analysis. *IEEE Sens. J.* **6**, 1218 (2006).
- [7] W. Choi, C. Fang-Yen, K. Badizadegan, S. Oh, N. Lue, R.R. Dasari, M.S. Feld, Tomographic phase microscopy. *Nat. Methods* **4**, 717 (2007).
- [8] S.C. Brooks, E.R. Locke, H.D. Soule, Estrogen Receptor in a Human Cell Line (MCF 7) from Breast Carcinoma. *J. Biol. Chem.* **248**, 6251 (1973).

Summary: We describe a new evanescent-wave fluorescence excitation method, suitable for imaging of biological samples. The excitation light propagates in a planar optical waveguide, consisting of a thin waveguide core placed between a sample in an aqueous solution and a polymer with a matching refractive index, forming a symmetric cladding environment. The penetration depth of the excitation field into the sample can be adjusted by choosing the proper thickness and material for the waveguide layer, thus extending the range of penetration depths provided by more conventional evanescent-wave techniques, such as total internal reflection fluorescence microscopy. The symmetric configuration yields a superior image quality and offers clear advantages over other waveguide excitation methods, such as the possibility of direct end-fire excitation from a single-mode optical fiber, eliminating the need for gratings and resonant angle excitation.

Um höfundana:

Björn Agnarsson er doktorsnemi í eðlisfræði við Háskóla Íslands. Jennifer Halldorsson er með doktorspróf í efnafræði frá háskólanum í Wollongong í Ástralíu og starfar sem nýdoktor við Raunvísindastofnun Háskólans. Nina Björk Arnfinnsdóttir er meistaranemi í eðlisfræði við HÍ. Sævar Ingþórsson er doktorsnemi við læknaeild HÍ. Þórarinn Guðjónsson líffræðingur er dósent við læknaeild HÍ og forstöðumaður rannsóknastofu í stofnfrumufræðum. Kristján Leósson eðlisverkfræðingur er vísindamaður við Raunvísindastofnun Háskólans.

^aRaunvísindastofnun Háskólans

Dunhaga 3, 107 Reykjavík

^bLífvísindasetur Læknagarðs

Vatnsmýrarvegi 16, 101 Reykjavík

k.leosson@raunvis.hi.is

Móttekin: 7. nóvember 2008

