

НОБЕЛОВА НАГРАДА ЗА ХЕМИЈА ЗА 2014 ГОДИНА

Нобеловата награда за хемија за 2014 година им е доделена на Ерик Бетциг (Eric Betzig), Стефан В. Хел (Stefan W. Hell) и Вилјам Е. Мернер (William E. Moerner) за развивање на флуоресцентна микроскопија со голема моќ на резолуција помала од 0,2 μm , како и за решавање на проблемот на долната граница на резолуција во оптичката микроскопија позната како Абеова долна граница на резолуција на оптичкиот микроскоп, според Ернст Абе (Ernst Abbe).

Со оваа метода истражувачите со помош на флуоресцентни бои или со протеини кои флуоресцираат можат да ги испитуваат и следат интеракциите помеѓу одделните молекули во клетките. Со оваа микроскопија може да се следат големите макромолекули, особено протеините во нормална или патолошка состојба на нанониво. На таков начин класичната оптичка микроскопија станува **наноскопија**.



Ерик Бетциг



Вилјам Е. Мернер



Стефан В. Хел

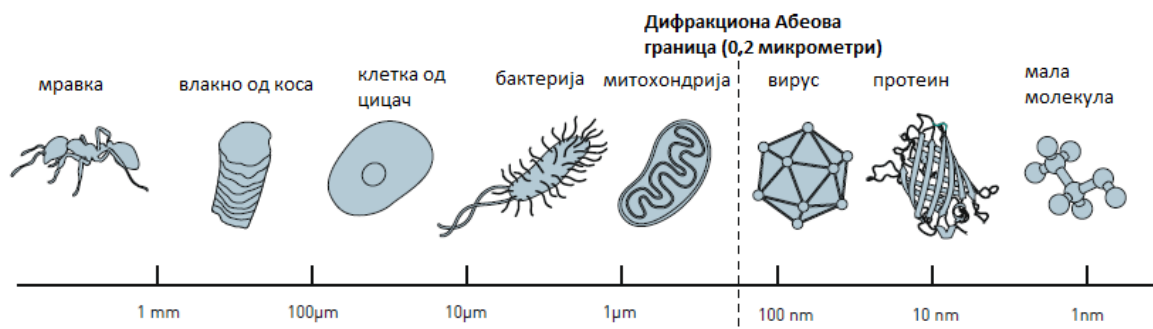
Кога научниците од XVII век започнале да ги истражуваат живите организми со помош на класичен оптички микроскоп, за прв пат пред нивните очи се отворил еден нов свет. Тоа претставувало раѓање на микробиологијата и со тоа микроскопот станал една од најважните алатки за испитување во биологијата. За анализа со овој тип микроскопија, била потребна претходна подготовка на препаратите, при што доаѓало до денатурирање на нивните одделни делови.

Освен слабостите околу подготовката на препаратот, класичната оптичка микроскопија имала ограничени можности поради нејзината резолуција, која покрај другите фактори, зависи и од брановата должина на светлината. Имено, во 1873 познатиот истражувач Ернст Абе ја објавил познатата Абеова равенка за резолуцијата на оптичкиот микроскоп,

$$D = \frac{\lambda}{2n} \text{ или } D \approx \frac{\lambda}{2},$$

каде што λ е бранова должина на упадната светлина, а n е индекс на прекршување на светлината за соодветна средина.

Во поголем дел од XX век се сметало дека со класичната оптичка микроскопија не може да се анализираат делови од микросветот помали од половина од брановата должина од упадното зрачење, т.е. делови помали од 0,2 μm . Таа граница е позната како **дифракциона Абеова граница** (слика 1).



Слика 1. Споредба на димензиите на делови од микросветот

Со оптичката микроскопија во областа до околу 0,2 μm може да се забележат контурите на деловите на некои типови органели, меѓутоа не може да се анализираат нивните помали делови, т.е. нивните детали, за да се следат интеракциите помеѓу одделните протеински молекули или честички во клетките и другите поголеми молекули. Ако се направи споредба со макросветот, тоа би било исто како да се гледаат големите згради во градовите без да може да се препознаат поважните нивни делови, на пример прозорците, или жителите во тие големи згради.

Равенката на Абе сè уште важи, но годинашните добитници на Нобеловата награда за хемија покажале дека оваа равенка може да се примени и за честички и објекти со помали димензии од 0,2 μm , т.е. под т.н. **дифракциона Абеова граница** (слика 1). На таков начин тие значително ја зголемиле резолуцијата на класичната микроскопија со користење на флуоресцентни соединенија со кои се означуваат поголемите молекули како што се протеините и нуклеинските киселини и нивните деривати, комплекси и сл. На таков начин, теориската граница на класичната микроскопија се зголемила и поради тоа таа станува **наноскопија**.

Имено, уште кога ја работел својата докторска дисертација на Универзитетот во Хајделберг во 1990 година, Стефан Хел барал начин да ги реши ограничувањата на класичната микроскопија кои ги дефинирал Ернст Абе пред повеќе од еден век.

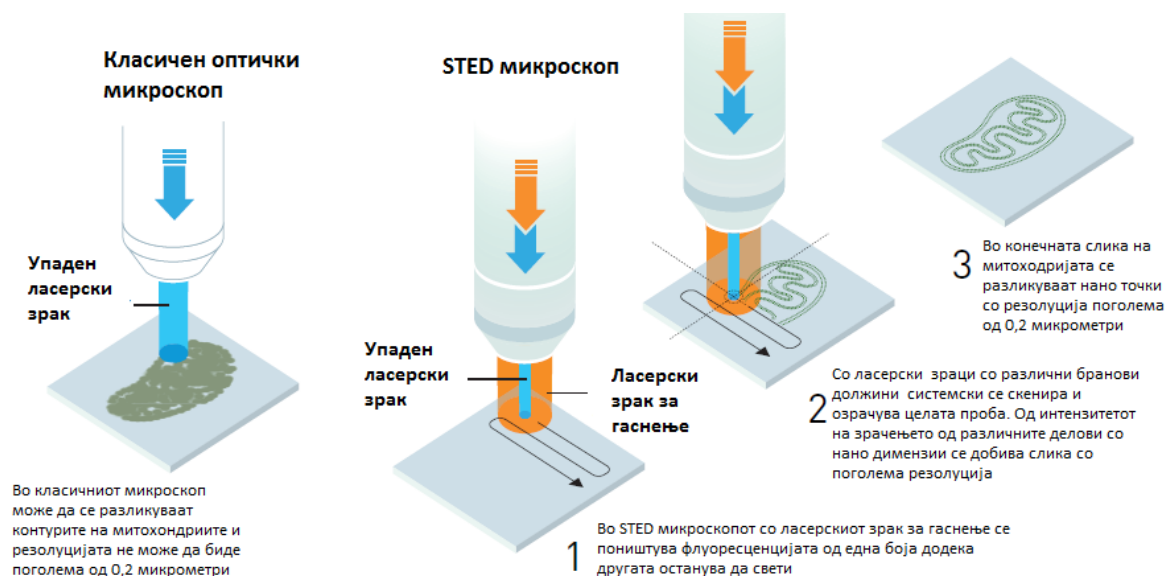
Проблемот со Абеовата равенка бил решен со помош на еден вид протеини кои се познати како зелени флуоресцентни протеини, со кои било возможно да се изведуваат различни видови експерименти со кои за првпат со класичната оптичка микроскопија можела да се испитува една одделна молекула.

Покрај тоа, покрај примената на зелените флуоресцентни протеини, проблемот на решавањето на долната Абеова граница бил решен и со употребата на методата на скенирање на многу мали волумени со нанодимензии од клетката, во коишто молекулите или честичките се означени со антитело и спрегнати со флуоресцентна боја. Вака подготвената проба за анализа потоа се ексцитира со краток ласерски пулс, односно настанува процес на стимулирано флуоресцентно зрачење. Така, на пример, со означување на клеточната DNA спакувана во јадрото, која е претходно означена со флуоресцентна боја, таа почнува да свети во централниот дел од клетката. На таков начин истражувачите можеле да го определат само местото на наоѓање на означената молекула во клетката. Тие со оваа метода не биле во можност да го определат местото на наоѓање на соседните молекули кои се заплеткани во сложената структура на јадрото околу DNA. Со други зборови, резолуцијата била многу мала за да се разликуваат одделните делови околу кластерот молекули околу DNA, т.е. одделните низи на DNA или, со други зборови, како да гледате цело вретено без да можете да видите одделни влакна од волницата.

Во 1994 година Стефан Хел објавил една статија во која ги изнел основните идеи кои всушност се основни принципи за т.н. **стимулирано емисионо празнење**, односно ги удрил основите на STED-микроскопијата (од англ. Stimulated Emission Depletion). Според овој принцип, со пулсен ласер се ексцитираат сите молекули означени со флуоресцентни бои, додека со друг пулсен ласер со друга фреквенција се врши т.н. гаснење на сите молекули, освен оние кои се сместени во многу мал волумен со нанодимензии означени со друга

флуоресцентна боја (слика 2). Потоа се врши детектирање само на флуоресцентното зрачење во тој дел од органелата.

Со скенирање надолж целиот примерок се мери интензитетот на емитираната светлина и врз основа на овие податоци се добива покомплетна слика за анализираната проба. Колку е помал волуменот на пробите означени со флуоресцентна боја толку е поголема резолуцијата на анализираната слика.



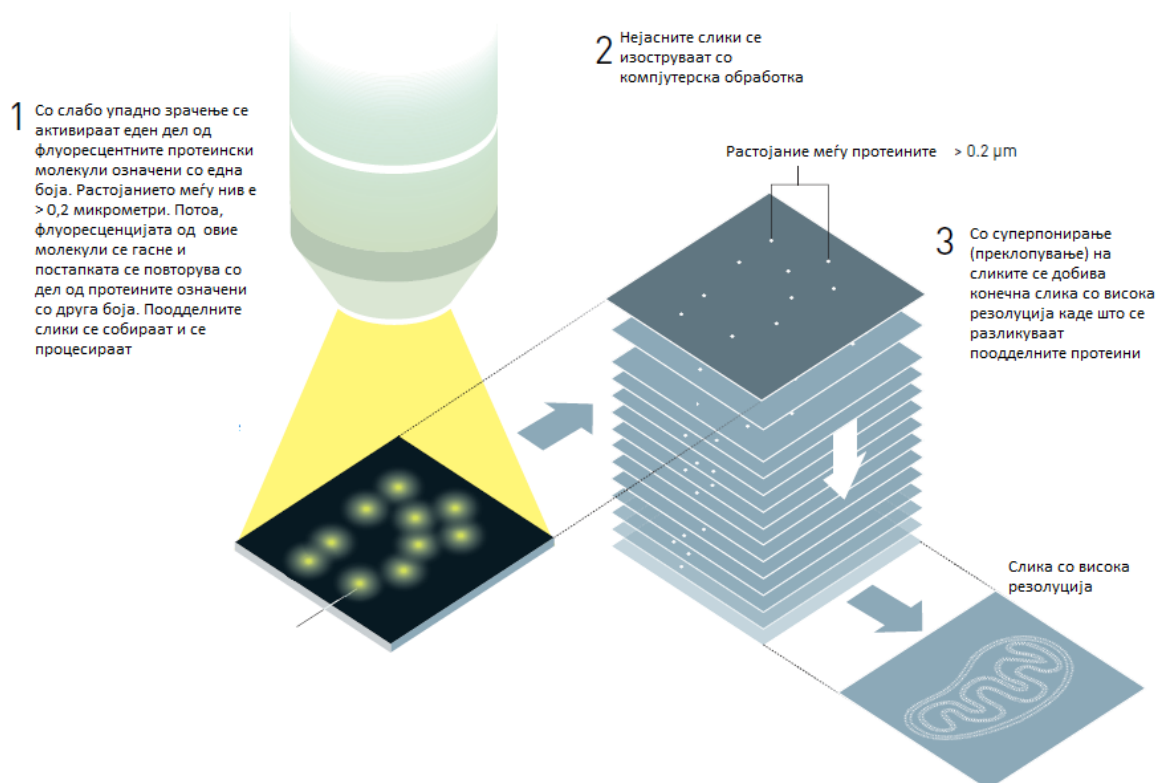
Слика 2. Шематски приказ на споредбата на класичната оптичка микроскопија со STED-микроскопијата

Со STED-микроскопот со системското скенирање на пробата до детекторот стигнува светлина емитирана од голем број означени делови од пробата со нанодимензии, при што се добива вкупната слика на испитуваната проба. Од добиените интензитети на емитираната светлина се добиваат одделни слики од секое одделно скенирање.

Овие одделни слики се користат за добивање конечна слика од скенирањето. За добивањето на крајната слика најголеми заслуги имаат Ерик Бетциг и Вилјам Мернер кои, независно еден од друг, ја развиле т.н. **метода на суперпонирање** (напластување на одделни слики) и компјутерска обработка на сликата. Имено, во 1989 година Вилјам Мернер бил првиот истражувач кој успеал да ја измери апсорпцијата на една молекула, што претставувало голем напредок. Исто така, Мернер открил дека кога една варијанта на т.н. зелени протеини се ексцитира со светлина со бранова должина од 488 nm, протеинот почнува да флуоресцира и потоа гасне и по краток временски период повторно свети кога ќе се озрачи со светлина со бранова должина од 405 nm. Мернер потоа со еден на прв поглед едноставен експеримент подготвил гел со дисперзирани молекули од овој тип протеини, и тоа на растојанија поголеми од Абеовата дифракциона граница од 0,2 μm . Бидејќи протеинските молекули биле дисперзирани и многу распрснати, тие можеле да се разликуваат со обичен класичен микроскоп. Под објективот на класичниот микроскоп тие изгледале како мали ламби со молекуларен прекинувач. Овие резултати биле објавени во престижното списание *Nature* во 1997.

Инспириран од Вилјам Мернер, меѓу другите и Ерик Бетциг почнал да се обидува да проверува дали може на класичниот микроскоп да ја зголеми резолуцијата со користење на молекули означени со различни флуоресцентни бои. Идејата била да се користи еден класичен микроскоп за еден вид боја со која се означени еден вид протеински молекули. Ако, на пример, во пробата сите протеински молекули се означени со една флуоресцентна боја и се дисперзирани низ некој медиум, на пример гел, на растојание ограничено со **дифракционата Абеова граница**, тогаш од интензитетот на флуоресцентната светлина, со овој микроскоп се добива положбата на честичката која емитира еден вид боја. Од

интензитетот на емитираната светлина се добива слика за таа честичка. За определување на положбата на другите молекули се користи друга боја и врз основа на нејзиниот интензитет се добива нова слика од која се определува положбата на другата честичка итн. Следниот чекор е овие слики да се суперпонираат (преклопуваат) и како краен резултат се добива слика со резолуција под дифракционата Абеова граница (слика 3).



Слика 3. Добивање на слика со висока резолуција со методата на суперпонирање

Киро Стојановски
Институт за хемија, Природно-математички факултет
Скопје, Македонија