

Kuidas näha elusate rakkude sisse?

Dmitri Lubenets, Toivo Maimets, Sulev Kuuse

Evolutsiooni käigus on inimese silmad arenenud nii, et kõige paremini suudame eristada värvasi ja valguse intensiivsust. See on peapõhjus, miks tavalises valgusmikroskoopias on laialt levinud tava preparaati värvida. Tänapäeval lubavad molekulaarbioloogia meetodid spetsiifiliselt ära märgistada raku siseseid organelle, kuid enamasti tuleb rakud enne surmata.

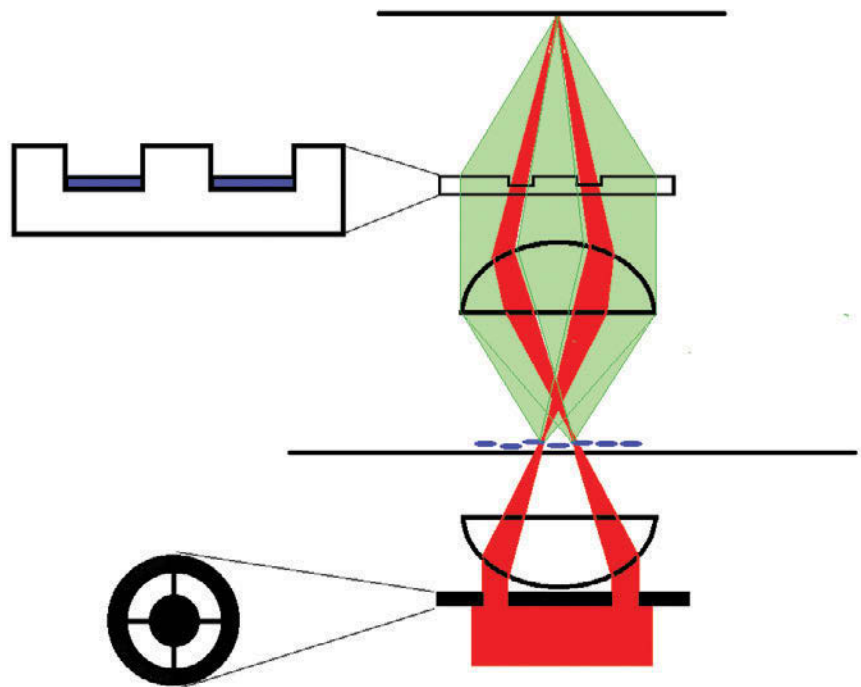
Elusate materjali on keerulisem värvida, tihti ei olegi see võimalik, kuna terviklik rakumembraan ja mittespetsiifilised raku membraanpumbad takistavad seda. Selle tõttu nõudis elusate rakkude vaatlus mikroskoobi aega ja tööd. Teadlastel oli hädasti vaja leitud meetod, mis võimaldaks korralikult visualiseerida läbiipaistvaid preparaate.

Faasikontrastmikroskoobi (ingl *phase-contrast microscope*) teoreetilist põhimõtet kirjeldas 1930. aastatel hollandi füüsik **Fritz Zernike**, kellele anti 1953. aastal Nobeli auhind. Esimese sedalaadi mikroskoobi töötas 1942. aastal välja Carl Zeiss.

Oletame, et inimene vaatab mikroskoobiga preparaati, mille eri rakud paiknevad üksteise suhtes mingil kaugusel. Kui vaadeldav preparaati on läbipaistev, siis valgus ei neeldu. Eri rakud ja raku siseseid struktuurid näevad intensiivsuse, kirkuse poolest välja peaaegu samasugused kui preparaadi taust ning eri detaile on raske eristada.

Samas on teada, et valguse levimise kiirus muutub tihedamas keskkonnas aeglasemaks. See tähendab, et footonid, mis kulgevad rakkudest mööda, jõuavad inimese silma natuke kiiremini kui footonid, mis liiguvad rakkudest läbi. Sellist fenomeni nimetatakse valguse faasinihkeks.

Faasinihke korral on oluline asjaolu, et valguse lainepikkus ega

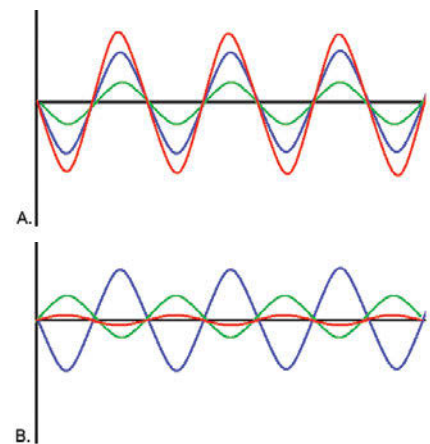


◇ 1. Faasiplaat (ülal) ja kondensorirõngas (all) tagavad valguse kustutatud interferentsi ja võimaldavad rakkudest saada näivalt ruumilise kujutise. Valgusallikas on joonisel all (kujutatud punasega), sinine katkendjoon on uuritav preparaati

intensiivsus ei muutu. Fritz Zernike geniaalsus seisneski selles, et ta mõtles välja, kuidas muundada nähtamatu faasinihe valguse intensiivsuse muutuseks ja tekitada silmale nähtav tume või hele kontrast.

Enne preparaadile sattumist läbib valgus spetsiaalse kondensorirõnga ehk faasirõnga (◇ 1) ja preparaati valgustatakse valguskoonusega, mille keskel on must ala. Sattudes läbipaistvate rakkude peale, jätkab enamik footoneid oma liikumist täiesti muutumatuna. Faasinihe tekib juhuslikult, kuid katsete põhjal on tõestatud, et keskmiselt jäävad footonid hiljemaks veerandi lainepikkuse võrra. Hiljaks jäävad footonid hajutatakse suvalistes suundades ning nad sisenevad objektiivi teise nurga all kui oma teekonnal muutumata jäänud footonid.

Edasi satuvad kõik footonid faasiplaadile. See nihutab need footonid, mida preparaadi läbimine pole muutnud, faasis esiteks ette (veerandi lainepikkuse võrra) ja vähendab selle valguse intensiivsust 70–75%.



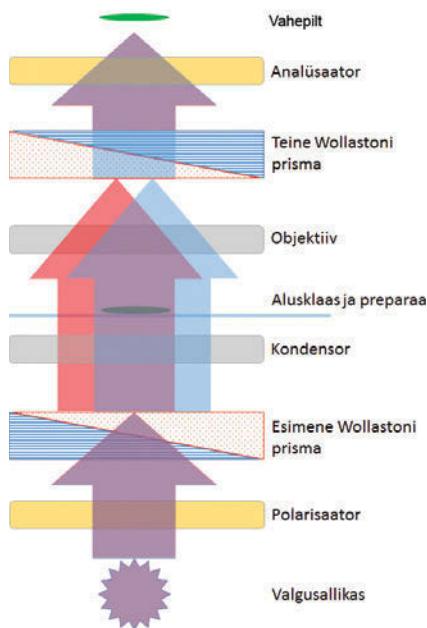
◇ 2. A. Kui valguslained on samas faasis (sinine ja roheline joon), siis nende summaarne intensiivsus on suurem (punane joon). B. Eri ehk vastasfaasides toimivate valguslainete (sinine ja roheline joon) korral on liitlaine intensiivsus väiksem (punane joon)

Kondensorirõngas ja faasiplaat on vajalikud selleks, et suurendatud kujutise tekkekojas saaks teoks veel üks optiline fenomen: kustutatav interferents (ingl *destructive interference*),

mille tõttu valguse intensiivsus vähe-
neb. Kõige lihtsamini saab seda sele-
tada graafiliselt (◇ 2).

Kuigi faaside nihutamise võtted
on faasikontrastmikroskoopias häda-
vajalikud, ei saa üksnes nendega pii-
savalt kontrastset pilti, kuna valgus-
allikast lähtuva valguse intensiivsus
on liiga suur. Just selle pärast on faa-
siplaat pimendatud poolläbipaistva
kattega, mis laseb läbi ainult 25–30%
peale langevast valgusest. Nii muun-
dab faasikontrastmikroskoop prepa-
raadi stimuleeritud faasiinikud val-
guse intensiivsuse muutuseks ning
enne nähtamatud struktuurid ilm-
nevad kui tumedad alad mõõdukalt
heledal taustal.

**Lahutatud interferentskontrasti
mikroskoopia ehk DIC-mikroskoopia**
1950. aastatel leiutati veel üks mik-
roskoopiameetod, millega saab läbi-
paistvaid preparaate teha nähta-
vaks. Seda nimetatakse **lahutatud
interferentskontrasti mikroskoo-
piaks** ehk **DIC-mikroskoopiaks**
(ingl *differential interference con-
trast microscopy*, DIC) või väljatöota-
ja Georges Nomarski järgi **Nomarski
mikroskoopiaks** ehk **Nomarski
interferentsmikroskoopiaks** (ingl
Nomarski microscopy, *Nomarski
interference microscopy*, NIC). Ka
DIC-meetod põhineb valguse interfe-



◇ 3. Eristava ehk lahutava interferents-
kontrasti mikroskoobi üldskeem

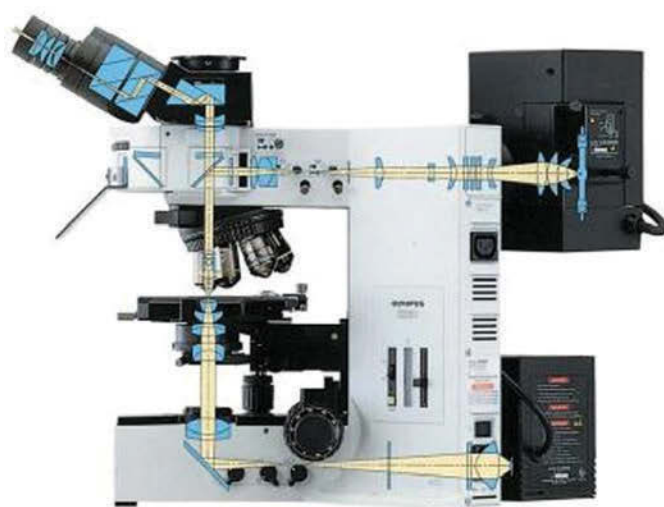
rentsi fenomenil, kuid tehnilised võt-
ted, millega saavutatakse vajalik val-
guse faasiinide, on DIC-i puhul teist-
sugused. See mikroskoop meenutab
tavalist valgusmikroskoopi, ent peale
tavakomponentide on sellel kaks val-
gust polariseerivat seadet ja kaks eri-
list prisma (◇ 3).

Mikroskoobi koostisosa on kaks
kokkuliimitud kvartsi- või kaltsiidi-
kristallist Wollastoni prisma; neist
esimene asub enne kondensorit ja

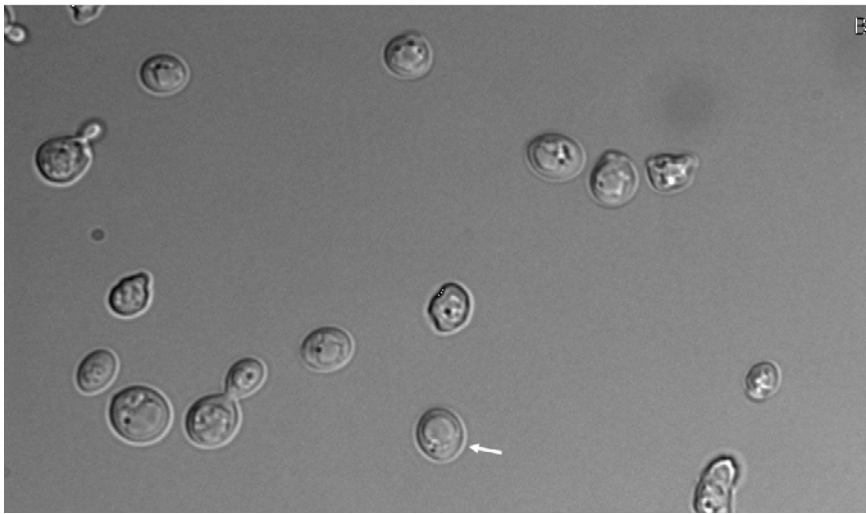
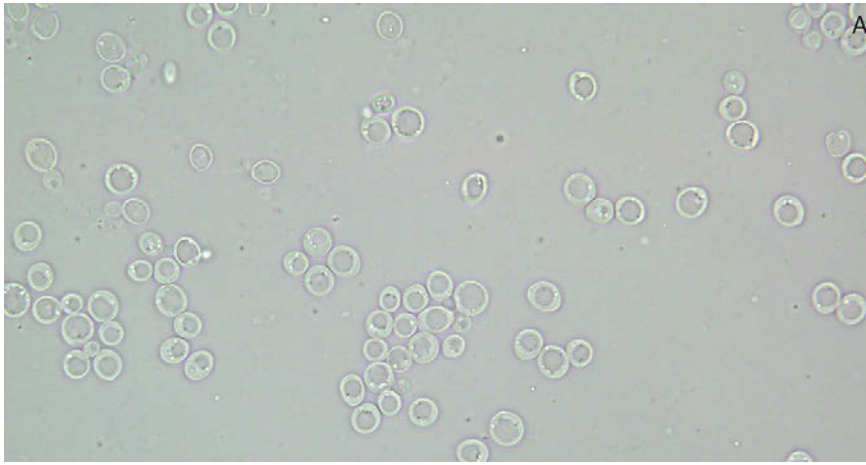
teine objektiivi järel. Esimene pris-
ma jaotab langeva valguskiire kaheks
ruumiliselt lahutatud kiireks. Need
liiguvad läbi preparaadi kumbki oma
rada ja satuvad teise Wollastoni pris-
masse, mis ühendab need taas.

Esimesesse prismaisse tohib sat-
tuda üksnes kindla polarisatsiooni-
ga valgus, mille tagab eriline seade
– polarisaator. Järgmine polariseeriv
seade, analüsaator, asub teise pris-
ma taga. Tänu analüsaatorile muu-
tub valguse polarisatsioon nii, et
kokku pandud valguskiirte vahel toi-
mub kustutav või võimendav interfe-
rents. Nõnda tekib ainulaadse kolme-
mõõtmelise muustriga pilt, mida vaa-
dates on tunne, et preparaati on val-
gustatud ainult ühelt küljelt (vt ◇ 5).
Samuti tundub, et vaadeldav objekt
on kolmemõõtmeline, kuid alati tuleb
meeles pidada, et see on optiline illu-
sioon, mis võimendab reaalsust.

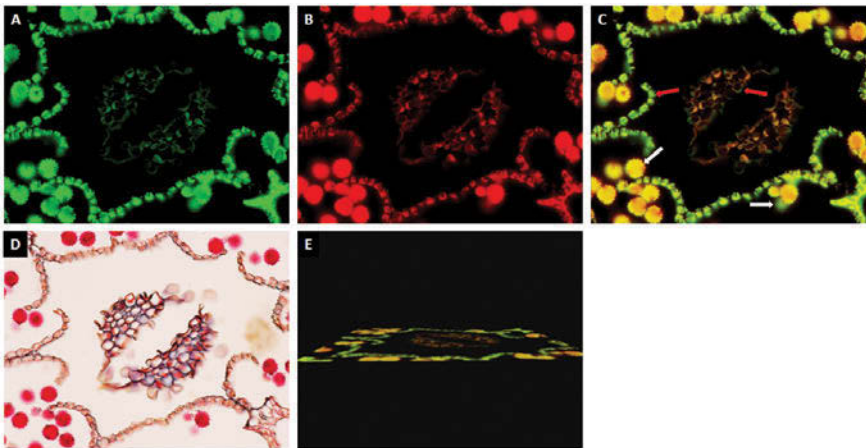
Tänapäeval saab tavalise valgus-
mikroskoobi abil väga edukalt jäl-
gida rakkude morfoloogiat ja kõiki
teisi põhikujutisi, mis neelavad, haju-
tavad või muudavad valguse faasi.
Väiksemad rakusisesed struktuurid,
nagu valgud, nukleiinhapped või io-
nid, on valgusmikroskoopia lahutus-
võimest palju väiksemad ja jäävad
seetõttu nähtamatuks. Selleks et teha
need visuaalseks, tuleb nad seostada
fluorestseeruva märkega ning kasu-



◇ 4. Nüüdisaegne fluorestsentsmikroskoop. A – skeemil on näidatud nähtava valguse teekond (alumine valgusallikas) ja fluo-
restsentsvalguse teekond (ülemine valgusallikas) läbi objektiivi objektini ja registreeriva okulaarini. B – fluorestsentsvõimeku-
sega uurimismikroskoop Olympus BX41 (Jaapan), arvutikuva inimese emaka endomeetriumi (kasutatud programmi CellB,
Soft Imaging System, Olympus)



◇ 5. Pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae*. A – fotografeeritud tavalise valgusmikroskoobiga, suurendus 100 x. B – DIC-mikroskoobis nähtav preparaat, suurendus 100 x, okulaar 10 x. Fotot vaadates tundub, et rakud on valgustatud ühelt küljelt (valge nool)



◇ 6. Fluorestsentsmikroskoobi kujutised teekummeli õie ristlõikest. A – preparaadi autofluorestsents rohelises spektris. B – preparaadi autofluorestsents punases spektris. C – piltide A ja B kokkulangemise tulemus. Fookuses olevad objektid on märgistatud punaste nooltega, fookusest väljas olevad objektid aga valgete nooltega. D – samast kohast võetud pilt värvilise kaamera abil läbiva nähtava valguse käes. E – pildil C olev kujutis on vaatelejale arvuti abil terava nurga alla keeratud. On näha, et fluorestsentsmikroskoobiga tehtud objekti visuaal on tegelikult tasapinnaline. Mikroskoop Olympus BX81, objektiiv 60 x. Töödeldud pilditöötlustarkvaraga Imaris (Bitplane AG, Zürich, Šveits)

tada mikroskoopi, mille optika on kohandatud fluorestsentsi kindlaks tegema (◇ 4).

Kõik **fluorestsentsmikroskoopia** (ingl *fluorescence microscopy*) võtted põhinevad eriliste molekulide kasutamisel, mis ergastava valguse toimel kiirgavad fluorestsensit valgust. Erakordse tundlikkuse tõttu võimaldab see meetodika määrata kindlaks makromolekulide, metaboliitide ja isegi raku sees olevate väikeste ioonide asukohta ning jälgida nende kogust ja liikumist raku sees.

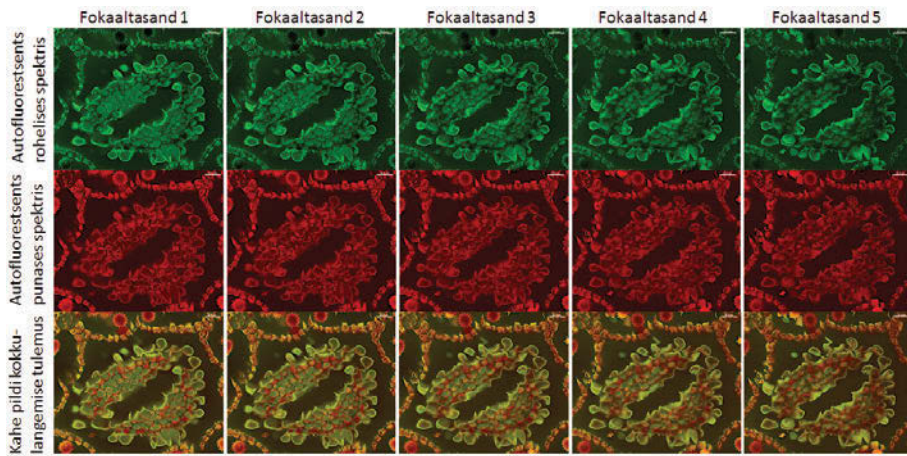
Mõnikord võib rakk või rakusisene valgus kiirata valgust iseenesest. Säärase objekti kohta öeldakse, et tal on suur **autofluorestsents**. Kuid palju sagedamini pakuvad huvi molekulid, mis ei fluorestsene, ja neid tuleb märgistada eriliste fluorestsensit värvidega: **fluorokroomidega**.

Alternatiivse meetodika puhul märgistatakse fluorokroomidega antikehasid, mis seostuvad teatud valgulise epitoobi ehk antikehaga äärmiselt spetsiifiliselt. Teatud tingimustes (nt fikseerides) pääsevad sellised antikehad rakkude sisse, seostuvad oma sihtmärgiga ning võimaldavad nõnda uuritavat kaudselt vaadelda.

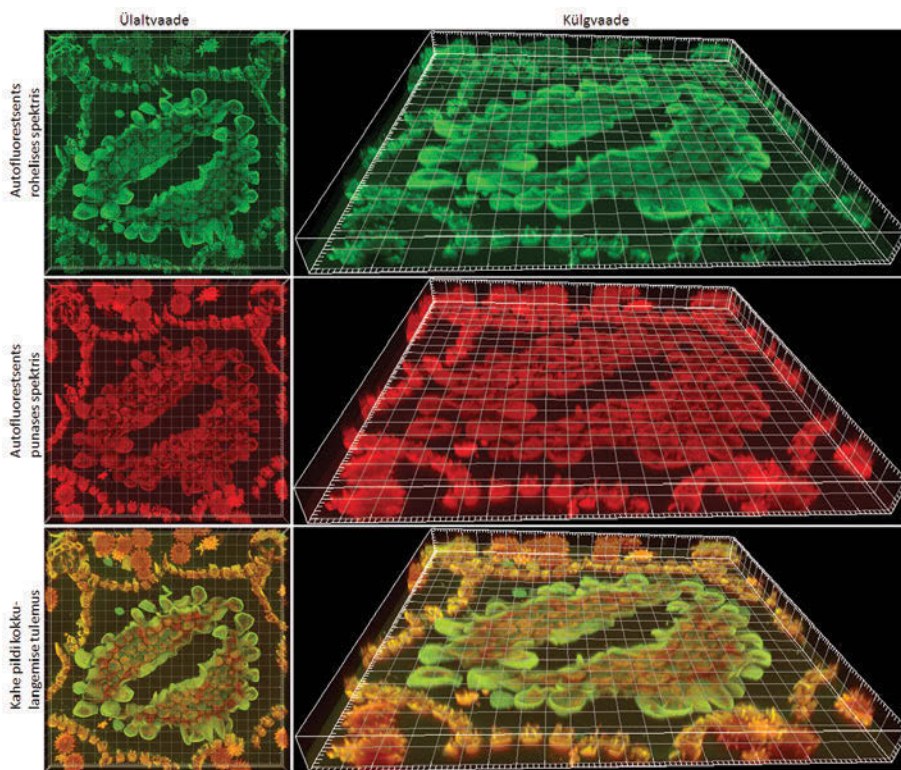
Praegusajal on fluorestsentsmikroskoopia üks enim levinud mooduseid. Selle populaarsus hakkas suurenema aastast 1941, kui Ameerika immunoloog **Albert Hewett Coons** leiutas meetodi, millega sai fluorokroomide liita valkudele. Samuti etendas suurt rolli optika ja optoelektronika areng, mille tõttu oli võimalik avastada fluorestsentsi paremini ja tundlikumalt.

Nüüdisaegne fluorestsentsmikroskoop sisaldab spetsiaalseid optilisi filtreid ja võimsamat valgusallikat. Seda optikariista on suhteliselt lihtne kasutada, kuid siiski peab teadlane oskama mikroskoopi korrektselt seadistada ning valima katse tarbeks õiged fluorokroomid.

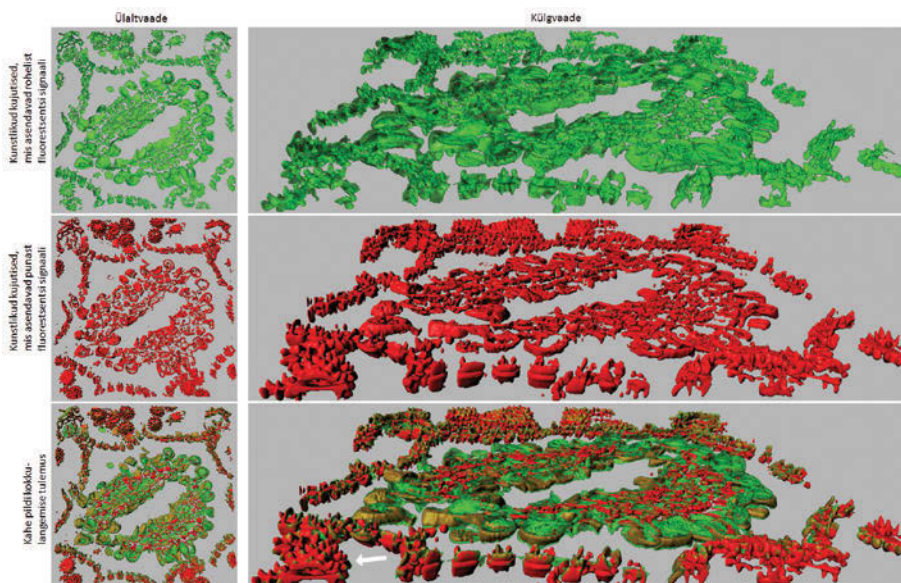
Selleks et fluorestsentsi saaks vaadata tavalise valgusmikroskoobiga, peab sellel olema võimas valgusallikas ja optiliste filtrite komplekt. Objektiivid peavad olema hea kvaliteediga, sest objektiivi läätsete abil valgustatakse nii preparaati kui ka



◇ 7A. Kummeliõie sarivõtte konfokaalmikroskoobiga. Iga foto on pildistatud eri fokaaltasandil. Autofluorestsentsisignaaliid roheli- ses ja punases spektris on toodud eraldi ja ka liidetuna ühele fotole. Pildistatud konfokaalmikroskoobiga Olympus FV1000, objektiiv 60 x, mõõtjoone pikkus 20 µm. Töödeldud pilditööstlustarkvaraga Imaris (Bitplane AG, Zürich, Šveits)



◇ 7B. Kummeliõie eri fokaaltasandite pildid on kokku pandud üksteise peale. Joonisel on näidatud tulemus pealt- ja külgvaates. On näha, et konfokaalmikroskoobiga tehtud pildisari moodustab kolmemõõtmelise struktuuri. Piltide töötlemiseks on kasutatud tarkvara Imaris (Bitplane AG, Zürich, Šveits). Konfokaalmikroskoop Olympus FV1000, objektiiv 60 x



◇ 7C. Kolmemõõtmelise struktuuri detailanalüüs. Tõeline signaal on asendatud tehiskujutisega, kus värvus vastab fluorestsentsi värvusele. Kui originaalpilti on sedaviisi modifitseeritud, siis on mugavam analüüsi teha, sest saab paremini kontrollida tehiskujutiste kuju ja läbipaistvust. Fotodel kujutatud jooniste piirkonnad on kummeliõie samast kohast, kuid joonisel 7C on valge joonega tähistatult näha, et õietolm on tegelikult sfäärilise kujuga (valge nool). Pilte on töödeldud tarkvaraga Imaris (Bitplane AG, Zürich, Šveits). Konfokaalmikroskoop Olympus FV1000, objektiiv 60 x

võetakse vastu fluorestsentsisignaali. Teiste sõnadega, põhiotstarbe kõrval täidab objektiiv ka kondensori rolli.

Tüüpiline fluorestsentsmikroskoobi optiline rada on kujutatud joonisel 4. Esmalt jõuab valgus valgusallikast filterkuubikusse, mille abil õige lainepikkusega valgus suunatakse objektiivi kaudu preparaadile. Proovis olevad fluorokroomid ergastuvad ja tekib fluorestsentsvalgus, mis omakorda, läbides objektiivi ja filterkuubiku, jõuab vaatleja silmadesse.

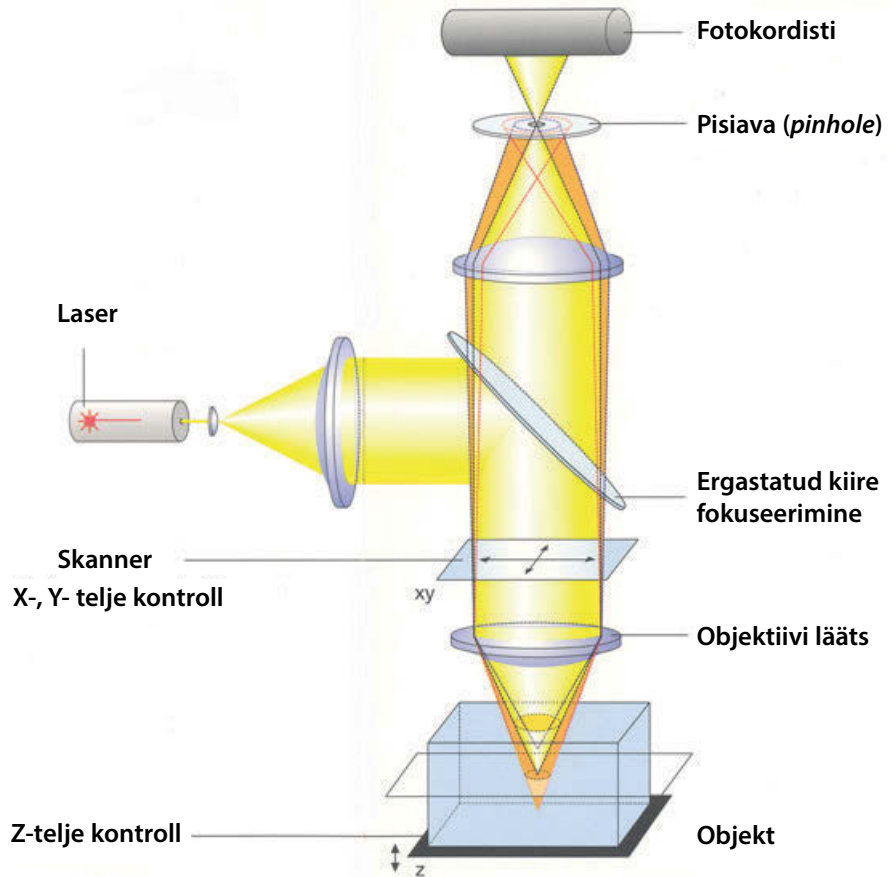
Fluorestsentsmikroskoobi valgusallikas võib olla laser või spetsiaalne lamp. Laserid annavad väga tugeva monokromaatilise ja muutumatu faasivahega valguse, neid kasutatakse eriliste mikroskoopiavõtete puhul sageli. Tavalise fluorestsentsmikroskoobi puhul on kõige levinumad elavhõbe- või ksenoonlambid.

Konfokaalmikroskoopia

Fluorestsentsmikroskoopia tähtsust maailma eluteaduses ei saa alahinnata. See lubab preparaati uurida väga üksikasjalikult, ent teatud ülesandeid võib siiski olla raske teha. Täpselt nagu tavaline valgusmikroskoop, annab ka fluorestsentsmikroskoop terava pildi ainult fokaaltasandist. Kõik ergud fluorestsentsisignaaliid, mis tulevad fokaaltasandist väljastpoolt, näivad lõpp-pildil olevat fookusest väljas. See tähendab, et suuremad kumerad rakud või jämedad koelõigud paistavad ebamäärased. Seetõttu on tulemust sageli keeruline tõlgendada. Peale selle näeb tavalise mikroskoobiga seda, kus paikneb fluorestseeruv objekt horisontaaltasapinnal ehk x- ja y-teljel. Ent asetsemise kohta vertikaaltasapinnal ehk z-teljel pole õigupoolest võimalik midagi järeldada (◇ 6).

Harilik fluorestsentsmikroskoopia ei anna vastuseid sellele, milline on preparaadi kolmemõõtmeline struktuur. Nendele küsimustele saab vastused konfokaalmikroskoopia abil.

Konfokaalmikroskoopia (ingl *confocal microscopy*) põhimõtete patentis Harvardi ülikooli töötaja **Marvin Minsky** 1957. aastal, ent töötav instrument ilmus turule mitu



◇ 8. Konfokaalmikroskoobi skeem

aastat hiljem. Sisuliselt skaneerib see aparaat objekti punkt punkti järel ning korruga ainult teatud sügavuses.

Tehniliselt rajaneb konfokaalmikroskoop traditsioonilisel fluorestsentsmikroskoobil, kuid elavhõbe- või ksenoonlambi asemel valgustatakse preparaati laseriga (◇ 8).

Konfokaalmikroskoobis valgustatakse igal ajahetkel ainult väikest ala proovist. Seetõttu võib väljuv signaal olla väga nõrk. Sestap kasutatakse signaali tabamiseks spetsiaalset optilist detektorit: fotokordisti (ingl *photo-multiplier tube*, PMT). Fotokordisti abil saab signaali ilma taustamüra tekketa võimendada umbes miljon korda.

Kordistist väljuvad elektroonilised impulsid, mille tugevus on proportsionaalne sissetuleva valguse intensiivsusega. Elektrooniline signaal tuleb arvutisse, kus seda tõlgendatakse ja tuuakse esile pikslina. Sel moel, kui laserikiir liigub mööda preparaati, püüab signaali tabamissüsteem pidevalt tulevaid footoneid kinni, muudab neid elektrisignaalideks ja reastab

pikslid õiges järjekorras, tekitades sellega arvuti kuvaril lõpp-pildi. Kõik need etapid kulgevad niivõrd kiiresti, et pilt tundub arvuti ekraanil tekkivat reaajas.

Saamaks pilti objekti eri tasapindadest, on konfokaalmikroskoobi preparaadilaud tavaliselt mootoriga ning võimeline liikuma üles ja alla 10 nm täpsusega. Skaneerides proovi eri tasanditel, on võimalik saada pildisari, kus igal pildil on kujutatud preparaadi õhuke ristlõige. Kasutades eriprogramme, võib kogu sarja fotod ühendada üheks ruumiliseks kujundiks: kolmemõõtmeliseks struktuuriks, mis võimaldab proovi väga üksikasjalikult analüüsida (◇ 7). ■

Dmitri Lubenets (1981) on rakubioloog, Tartu ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi insener.

Sulev Kuuse (1962) on rakubioloog, Tartu ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi vivaariumi juhataja.

Toivo Maimets (1957) on Tartu ülikooli rakubioloogia professor.