

Aufbau eines TIRF-Mikroskops mit angeschlossener Mikrofluidik für die Detektion von fluoreszenzmarkierter Einzelmoleküle

A. Yang^{1,2*} und R. Börner^{1,2*}

¹ Laserinstitut, Hochschule Mittweida

* Korrespondenz: yang@hs-mittweida.de, richard.boerner@hs-mittweida.de

Kurzfassung. Am Laserinstitut Hochschule Mittweida (LHM) soll die Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie für die biophotonische RNA-Forschung etabliert werden. Das Ziel dieser Arbeit ist es, dafür ein Objektiv-basiertes interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskop (engl. total internal reflection fluorescence microscope, kurz TIRFM) mit einer alternierenden Laseranregung (engl. *alternating laser excitation* kurz ALEX) im Millisekundenbereich aufzubauen. Wir haben dafür einen geeigneten Detektionsstrahlengang für die farbkannalselektierte Aufnahme mit einer *scientific* CMOS Kamera entworfen. Die zwei Detektionskanäle ermöglichen es Abstandsänderungen mittels Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) auf molekularer Ebene zu messen. Neben dem Mikroskopaufbau wird in dieser Arbeit die Abbildung und Farbkannalselektion der fluoreszenzmarkierten Proben und die modulierte Laseranregung detailliert dargestellt.

1. Motivation

Erkenntnisse über biologische Strukturen und deren Baueinheiten, wie den Ribonukleinsäuren, kurz RNA, sind heutzutage unverzichtbar für die Pharmazie und Medizin sowie den gesamten Gesundheitssektor. RNA als eine der wichtigsten Baueinheiten des Lebens ist an vielen biologischen Prozessen in der Zelle beteiligt [1]. Dabei ist die Untersuchung und Analyse von RNA mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie ein über Jahrzehnte entwickeltes Verfahren und heute Stand der Technik. [2]. Bei der TIRFM wird ein Anregungslaserstrahl an den Rand der hinteren Fokusebene eines Mikroskopobjektives mit hoher numerischer Apertur (NA) fokussiert. Der Laserstrahl wird durch das hochnumerische Objektiv über den kritischen Winkel der Grenzfläche aus wässriger Probe (optisch dünn) und Objektträger (optisch dicht, z.B. BK7-Deckglas) gebrochen und an der Grenzfläche zwischen dem Deckglas und der Probe total reflektiert. Ein Teil der Strahlungsenergie wird dabei als exponentiell abfallendes, evaneszentes Feld in die Probe eingekoppelt. Dort kann es die fluoreszenzmarkierten Biomoleküle in einer Eindringtiefe bis zu wenigen hundert Nanometer anregen. Somit erzielt die TIRFM im Vergleich zu anderen fluoreszenzmikroskopischen Verfahren ein extrem niedriges Hintergrundrauschen [3; 4], das die Untersuchung von fluoreszierenden Einzelmolekülen ermöglicht.

2. Methodik

Unser TIRFM-Aufbau hat vier Hauptbestandteile (Abb. 1). Als Strahlquelle für die Anregung wurden zwei Laserdioden mit einer Wellenlänge von 515 nm und 638 nm eingesetzt. Die Laserleistung konnte durch die Steuersoftware im Bereich von 1 mW bis 150 mW eingestellt wer-

den. Eine zusätzliche Kontrolle der Laserleistung erfolgte durch ein Abschwächungsrads (optischer Dichtefilter). Der Laserstrahl wurde dann mittels eines Faserkopplers (Qioptiq) in eine Glasfaser eingekoppelt und so zum TIRF-Kondensator geleitet.

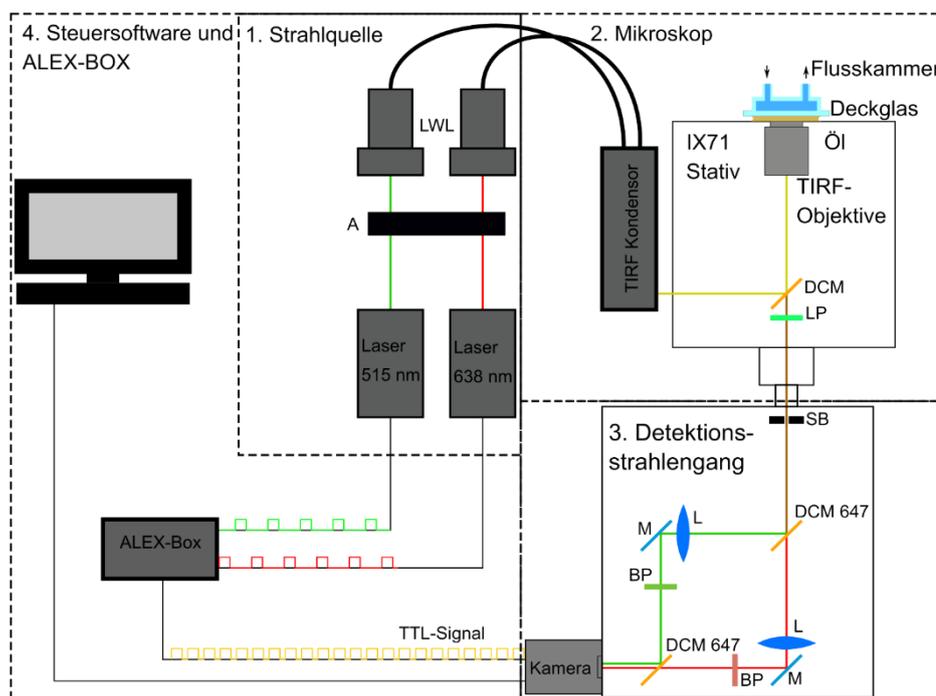


Abbildung 1: Schematische Darstellung des TIRFM-Aufbaus. A ... Abschwächungsrads; LWL ... Lichtwellenleiter BP ... Bandpassfilter; LP ... Langpassfilter; SB ... Spaltblende; DCM ... dichroitischer Spiegel; M ... Spiegel; L ... Sammellinse.

Das Mikroskop basiert auf einem IX71 Stativ mit kombinierten *Cell* TIRF-Kondensator (Olympus). Der TIRF-Kondensator hat eine fünf-achsiges Justagesystem, so dass der Anregungsstrahl genau auf die hintere Fokusebene des Ölimmersionsobjektive (NA = 1,5) fokussiert werden konnte. Im Filterrevolver wurde ein zweibändiger dichroitischer Spiegel (DCM) mit einem Langpassfilter (LP) kombiniert. Der DCM reflektierte die Anregungsstrahlung zum Objektiv und damit zur Probe. Im Gegensatz dazu wurde die Fluoreszenzemission der Probe durch den DCM und den LP transmittiert und in den Detektionsstrahlengang weitergeleitet. Das Anregungslicht wurde durch den LP weitestgehend unterdrückt. Im Detektionsstrahlengang wurde die Fluoreszenzemission der Probe durch einen weiteren DCM in zwei Farbkanäle separiert und schließlich auf eine *scientific* CMOS-Kamera abgebildet. Für eine optimale Abbildung des Mikroskopbildes auf die Kamera wurde eine Sammellinse je Farbkanal eingesetzt, die eine 1:1 Abbildung gewährleistete. Je ein Bandpassfilter pro Farbkanal diente dazu, nur den gewünschten Wellenlängenbereich zu detektieren und andere Spektralanteile wie z.B. Reste des Anregungslichts zu unterdrücken. Um das Sichtfeld des Mikroskops auf die Sensorgröße der Kamera anzupassen, wurde eine Spaltblende mit einer Öffnung von 13,3 mm x 6,5 mm an dem seitlichen Kameraausgang des Mikroskops positioniert. Dadurch werden zwei gleich große Bilder beider Farbkanäle auf dem Sensor der Kamera ermöglicht. Der gesamte Detektionsstrahlengang wurde mit eloxiertem Aluminium abgedeckt, um das Licht von außen zu blockieren. Die Anpassung der Abbildung und die Justage des Detektionsstrahlengangs wurde mithilfe einer selbst präparierten, fluoreszierenden *bead*-Probe durchgeführt (Abb. 2).

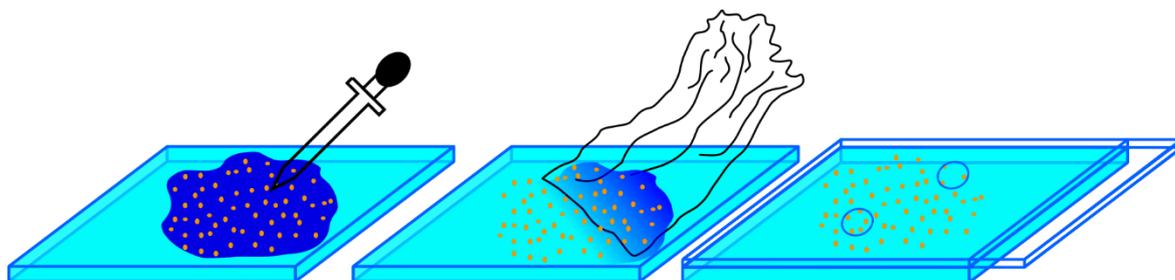


Abbildung 2: Arbeitsschritte der bead-Probenpräparation. (links) verdünnte bead-Probe wurde auf ein gereinigtes Deckglas pipettiert. (mitte) Überschüssiges Wasser wurde mittels Zellstoff entfernt. (rechts) Die Probe wurde mit einer Haftkammer (Grace Biolabs) verschlossen und vor Kontaminationen geschützt.

Die Steuersoftware (Micromanager) diente der Steuerung des Betriebsmodus und der Belichtungsdauer der sCMOS Kamera (Teledyn) sowie der Laserleistung beider Laserdioden. Die Modulation der Laserleistung wurde mittels des TTL-*fire*-Signals der Kamera realisiert. Dafür wurde das Signal der Kamera auf die ALEX-BOX und von dort auf die Laserdioden mittels BNC-Kabel übertragen. Das TTL-*fire*-Signal der Kamera wurde dafür mithilfe der ALEX-Box zu zwei alternierenden TTL-Signalen konvertiert, die so eine alternierende (an/aus) Intensitätsmodulation beider Laserlinien im ms-Bereich ermöglichte [5].

3. Ergebnisse

Um die Auflösung und Bildgebung des TIRFM zu testen, wurde ein Dauerpräparat eingesetzt. Die Auflösung des Mikroskops ist beugungsbegrenzt und beträgt $d_{m,\lambda=515\text{ nm}} = 0,21\ \mu\text{m}$ und $d_{m,\lambda=638\text{ nm}} = 0,26\ \mu\text{m}$. Die theoretische Auflösung der Kamera nach Nyquist beträgt $d_k = 0,15\ \mu\text{m}$ und ermöglicht so eine beugungsbegrenzte Abbildung. Die Pixelgröße der Kamera muss mindestens 2,3-mal kleiner sein als die Auflösung des Mikroskops [6]. Das Objektiv hat eine 100-Fach Vergrößerung und die Pixelgröße der Kamera ist $6,5\ \mu\text{m}$. Die Auflösung der Kamera und des Mikroskops kann mit folgender Formel berechnet werden (Rayleigh Kriterium) [7]:

$$d_{m,\lambda} = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA}$$

$$d_k = \frac{\text{Pixelgröße}}{\text{Objektivvergrößerung}} \cdot 2,3$$

Das benutzte Dauerpräparat enthält fluoreszenzmarkierte Muntjak Zelle (Abb. 3). Die Belichtungsdauer für die Aufnahme war $100\ \text{ms}$. Es wurden insgesamt 20 Bilder, also je Farbkanal 10 Bilder aufgenommen und gespeichert. Der Zellkern ist mit rot fluoreszierendem TO-PRO-3 markiert; die restliche Struktur der Zelle, insbesondere das Aktinfilamentgerüst, ist mit orange fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Bei der roten Anregung ist daher nur der Zellkern im roten Kanal zu erkennen. Dagegen ist bei der grünen Anregung die gesamte Zellstruktur im grünen Kanal sichtbar. Tatsächlich ist ein Teil des orangen Fluoreszenzlichtes auch im roten Kanal sichtbar. Die Ursache liegt daran, dass das bei grüner Anregung ein Teil des Fluoreszenzlichtes der orangen Farbstoffe im roten Kanal liegt; man nennt das Durchscheinen (engl. *bleed through*). Somit wurde immer bei der grünen Anregung rötliche Fluoreszenz erzeugt und von der Kamera detektiert. Mit diesem Aufbau ist es möglich eine fluoreszenzmarkierte Probe im ms-Bereich durch einen alternierenden Laser anzuregen und beugungsbegrenzt aufzunehmen.

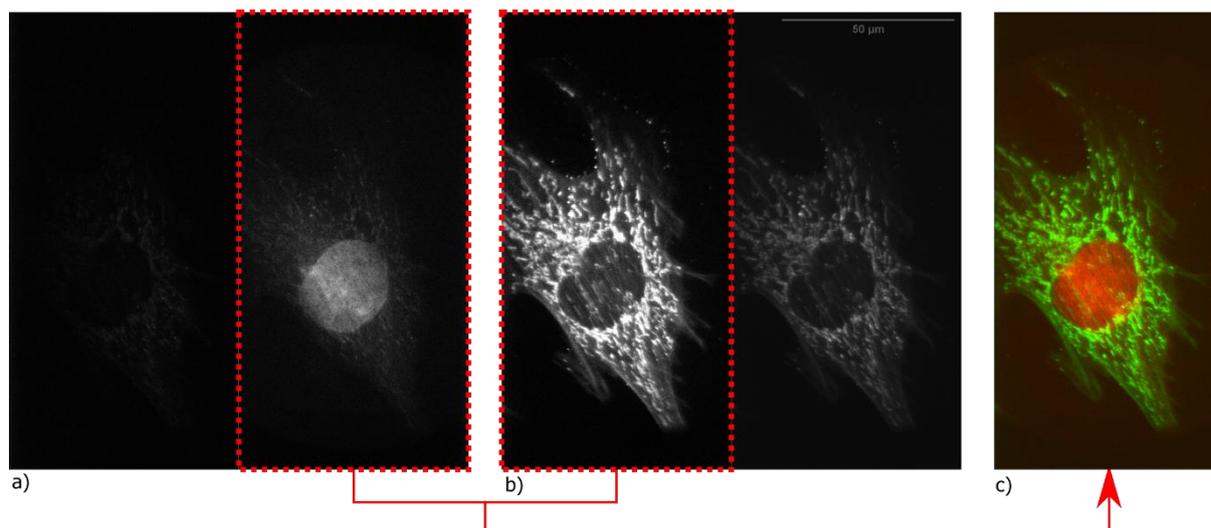


Abbildung 3: Aufnahme des Dauerpräparates. Die Muntjak Zelle wurde mit drei Fluorophoren: Alexa Fluor 488(Ex495/Em519), Alexa Fluor 555(Ex555/Em571) und TO-PRO-3(Ex642/Em661) markiert. a) Aufnahme der Zelle bei roter Laseranregung. Linkes Bild entspricht dem grünen Kanal und rechtes Bild entspricht dem roten Kanal. Beide Farbkanäle sind durch die rote Strichellinie getrennt dargestellt; b) Aufnahme der Zelle bei grüner Laseranregung; c) Kombiniertes Pseudo- oder Falschfarbenbild der sCMOS Kamera Aufnahme.

Nachdem wir das TIRF Mikroskop aufgebaut haben wird nun eine angeschlossener Mikrofluidik für die automatisierte Probenpräparation für Einzelmolekül-FRET-Experiment aufgebaut [8].

Datenverfügbarkeit

Die gezeigten Daten wurden selbst erhoben und nicht von Dritten genutzt und können von den Autoren erfragt werden.

Interessenskonflikte

Die Autoren erklären keine konkurrierenden Interessen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben. Zuerst gebührt mein Dank Prof. Richard Börner, der meine Arbeit wissenschaftlich betreut hat. Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Roland K.O. Sigel von der Universität Zürich für die Überlassung des TIRF-Kondensors und Mikroskopstativs sowie bei der Hochschule Mittweida und dem Laserinstitut Hochschule Mittweida für die finanzielle Unterstützung bei der Realisierung des gesamten optischen Aufbaus des TIRF Mikroskops.

Literaturverzeichnis

1. Scott W.G. (2014): "RNA. In: Amils R. et al. (eds) Encyclopedia of Astrobiology". Springer.
2. Schneckenburger, H. (2005): „Total internal reflection fluorescence microscopy: technical innovations and novel applications". Current Opinion in Biotechnology 16:13-18
3. Axelrod, D. (2001): „Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy in Cell Biology", Traffic 2:764-774
4. Michaelsen, H.; Börner, R. (2021): "Optimization of an optical setup for combined TIRF/confocal fluorescence microscopy", Hochschule Mittweida 2: 234-236
5. Kapanidis, A.N.; Laurence, T.A.; Lee, N.K.; Margeat, E.; Kong, X.; Weiss, S. (2005): "Alternating-Laser Excitation of Single Molecules", Acc. Chem. Res. 38: 523-533
6. <https://www.princetoninstruments.com/learn/camera-fundamentals/pixel-size-and-camera-resolution> [06.05.2022]
7. [https://de.wikipedia.org/wiki/Aufl%C3%B6sung_\(Mikroskopie\)](https://de.wikipedia.org/wiki/Aufl%C3%B6sung_(Mikroskopie)) [06.05.2022]
8. Bayraktar, T.; Pidugu, S.B. (2006): „Characterization of liquid flows in microfluidic systems", Int. J. Heat Mass Transfer 49, 815-824