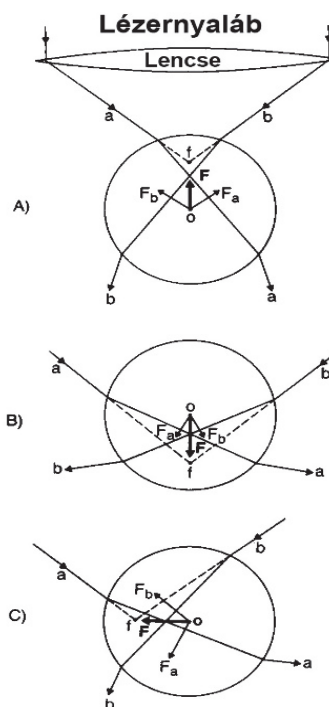


A lézercsipesz¹

II. rész

Az alábbiakban annak a megoldásnak a geometriai optikai magyarázatával ismerkedhetünk meg, amely áttörést hozott a biológiában és az orvostudományban. Olyan eredményekre vezetett, amelyeket más módszerrel nem (vagy csak nagyon nehezen) lehetett volna elérni, ugyanakkor igen nagy a jelentőségük a biológiai rendszerek működésének megértésében, forradalmat váltva ki e területen. Ashkin zsenialitásának köszönhetően lehetővé vált mikron méretű objektumok manipulálása közvetlen kontaktus és roncólás nélkül. Forradalminak számított az a tény, hogy egyedi biológiai részecskék külön-külön vizsgálhatókká váltak. Ma már tulajdonképpen ezen eljárást nevezzük lézercsipesznek, bár hasonló módszert alkalmaztak atomok csapdázására is. A lézercsipesz előnye az optikai levitációval szemben az is, hogy míg ez utóbbi a részecske súlyával megegyező erő kifejtésére képes, addig az optikai csipesz erő kifejtése akár ezerszerese is lehet a részecske súlyának, melyet csak a lézernyaláb erőssége korlátoz. Különösen előnyös olyan esetekben, amikor a gravitációs hatás elhanyagolható, és a Brown-mozgás dominál, például a vízben úszkáló biológiai mikroorganizmusok manipulálásakor. A néhány 100 mW teljesítményű, jól fókuszált lézernyaláb pN (1 pikonewton = 10^{-12} N) nagyságrendű erők kifejtésére képes, és értelemszerűen ugyanilyen nagyságú erők mérésére is alkalmas. Ezért optimális a biológiai rendszerekben fellépő erők nagyságának meghatározására is.

Az egyszerű lézercsipesz működésének elvét könnyen megérthetjük a 6. ábra alapján, ahol csak a refrakcióból származó erőket tüntettük fel egy O középpontú, átlátszó, gömb

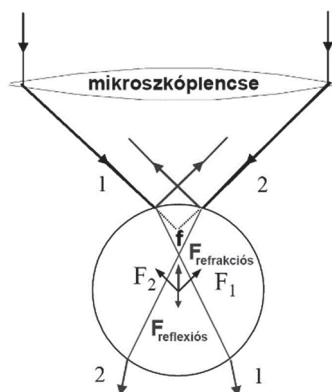


6. ábra

¹ Angolul laser tweezers, a Cell Robotics Inc. védett márkaneve

alakú mikrorészecske esetében. A lencsére érkező a és b párhuzamos sugárpáros fénytörésének eredményeként megjelenő F_a és F_b erők olyan eredő F eredő erőt eredményeznek, amely az f fókuszpont felé taszítja a részecskét a gömb O középpontjának különböző helyzeteiben.

A lézercsipesz megvalósításához olyan mikroszkóp objektívet kell használni, amely képes igen nagy szögben fókuszálni a lézernyaláb sugarait. Ez azért szükséges, hogy megfelelő nagyságú refrakciós erőt lehessen létrehozni. Könnyen érthető, hogy a tengelyhez nagy hajlásszög alatt érkező sugarak nagyobb mértékben járulnak hozzá a tengelymenti intenzitás-gradiens növeléséhez, és így az ezen irányú gradiens erők nagyságához. A valóságban azonban más erők hatását is figyelembe kell venni. Nem tekinthetünk el a reflektált sugarak által létrehozott fénynyomás (7. ábra), valamint a gravitációs erők hatásától. A mikrorészecske stabil csapdázása megköveteli, hogy az axiális irányú gradiens erők képesek legyenek ellensúlyozni ezen külső erők hatását.



7. ábra

A dipól approximációs modell (Rayleigh-tartomány)

Ha a részecske mérete jóval kisebb a fény hullámhosszánál ($R \ll \lambda$), az előzőekben ismertetett tárgyalásmód érvényét veszíti. A részecske kis mérete miatt a fénytörés, visszaverődés helyett más fizikai jelenségek eredményezik a csapdázáshoz nélkülözhetetlen erőhatásokat. A beeső fény szóródik a részecskén, melynek köszönhetően az impulzusátadás eredményeként a fény erővel hat a részecskére. A könnyebb és intuitívabb követhetőség érdekében szokásos az erőhatást két részre bontani. Az egyik a szórási erő megjelenését okozza. A beeső fényt az atom, vagy molekula elnyeli, a kapott energiának köszönhetően gerjesztett állapotba kerül. A fényhez tartozó mechanikai impulzus a részecske belső állapotát nem tudja befolyásolni, hanem csak mozgásállapotát változtathatja meg, a megvilágító fény terjedési irányába löki meg. Az atom a gerjesztett állapotból rövid idő múlva spontán emisszióval kerülhet vissza alapállapotába. A kibocsátott sugárzásnak nincs kitüntetett iránya, az atom izotrop módon (minden irányba egyenletesen) bocsát ki sugárzást, ezért a hozzárendelt impulzusváltozás térben kiátlagolódik. Így az atom eredeti impulzusa az abszorpcióval járó kitüntetett irányú lökés miatt változik meg, hat rá a beeső fény irányába erő. Ez az $F_{szór}$ szórási erő, amely arányos a beeső fény intenzitásával, valamint a részecske ún. szórási hatáskeresztmetszetével.

A másik erő a gradiens erő. Mivel a részecske térbeli kiterjedése jóval kisebb a fény hullámhosszánál, ennek elektromágneses tere egyenletesnek tekinthető a részecske teljes terjedelmére. Az elektromos tér hatására a pozitív és negatív töltések súlypontjai

eltolódnak, indukált dipólus² jön létre. Kis mérete miatt az indukált dipólus pontszerűnek tekinthető. A fény harmonikusan rezgő elektromos tere erővel hat az indukált dipólusra, melynek nagysága a számítások szerint arányos az I intenzitás változásának mértékével (gradiens I), és annak növekedése irányába mutat, fókuszált lézerefény esetén a fókusz felé. Tehát a szórási és gradiens erők az előző esetekben tárgyalatokhoz hasonlóan határozzák meg ezen esetben is a részecske viselkedését, csapdázását.

Lézersipesz a biotechnológiában

A lézersipesz az elmúlt néhány évtizedben a biológiai kutatások elterjedt eszközévé vált. Egyre nagyobb azon közlemények száma, melyekben az optikai csapdázással elért eredményekről számolnak be. A biofizika és biológia területén olyan kísérletek elvégzéséről, illetve nagy fontosságú információk megszerzéséről tudósítanak, melyeket más módszerekkel nem lehetett volna megszerezni. A következőkben néhány példával szeretnénk ezt érzékeltetni.

Amikor a lézersipesszel biológiai mintákon akarunk dolgozni, olyan lézert kell választanunk, amelynek fényét a biológiai anyagok kevésbé nyelik el. Bár a lézersipesz teljesítménye kicsi (1 mW – 100 mW közötti), a fókuszálás miatt a teljesítménysűrűség nagyon nagy – meghaladhatja akár a MW/cm² nagyságrendet –, és így az elnyelt fényenergia annyira felmelegítheti a sejteket, baktériumokat, hogy kárt tehet bennük. Általában ezek a részecskék vízben találhatóak, ezért olyan hullámhosszúságú lézerefényt kell használni, amely nem nyelődik el sem a vízben³, sem a mintában. Ennek a követelménynek a közeli infravörös tartományban működő lézerek fénye tesz eleget. Ezért a legelterjedtebbek a Nd:YAG (neodymium: ittrium-alumínium-gránát, folytonos üzemmódban működő, 1064 nm hullámhosszú szilárdtest lézer), infravörös dióda lézerek, esetleg He-Ne, illetve titán-zafír lézerek. Az elkövetkezőkben néhány könnyebben követhető kísérletet szeretnénk bemutatni.

A legegyszerűbb alkalmazás során a lézersipeszt mikromanipulátorként használják. Segítségével mikroszkopikus testek elhelyezkedését, elrendeződését változtatják meg. A csapdázott részecskéket előre eltervezett helyzetekbe lehet elrendezni, olyan részecske illetve sejt együtttest lehet létrehozni, amely előre megtervezett szerepnek tesz eleget. Mivel a lézeres mikromanipuláció nonkontakt eljárás, akár egy sejten belüli sejtalkotók is megragadhatók, átrendezhetők anélkül, hogy a sejtmembránban, vagy a sejt egyéb részében kárt tennének.

Optikai csipesszel történő erőmérés

Amennyiben egy csapdázott golyóra (pl. műanyag gyöngy) nem hat külső erő, egyensúlyban van, középpontja az optikai tengelyen helyezkedik el. Ha a fókuszponttól x kis távolságra kimoszdítjuk, rá olyan F erő hat, amely jó közelítéssel egyenesen arányos a fókuszpont és a gömb középpontja közötti távolsággal ($F = k \cdot x$). Ennek alapján a

² Elektromos dipólus: két azonos nagyságú, de ellentétes előjelű ponttöltésből áll, amelyek meghatározott, állandó távolságra vannak egymástól

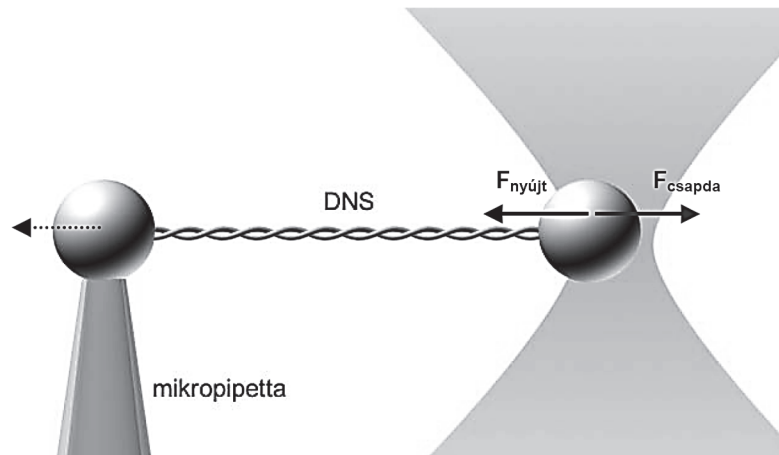
³ A víz abszorpció minimuma 1090 nm környékén van.

fénycsipesz működését úgy képzelhetjük el, mintha a csapdázott testet egy láthatatlan rugó kötné össze a fókuszponttal, melynek rugalmassági állandója a k arányossági tényező. Ha a golyóra az optikai tengelyre merőleges irányú külső erő hat, elmozdul az optika tengely és a külső erő által meghatározott síkban. Új egyensúlyi helyzetbe akkor jut, ha a külső erő és az optikai csapda által kifejtett erő egyensúlyban van egymással. A k arányossági tényező és a golyó elmozdulása ismeretében a csapda által kifejtett erő nagysága kiszámítható. A modern képanalízises technikákkal a golyó helyzetét 10 nm-es pontossággal lehet meghatározni.

A csapdát jellemző erőállandó kísérleti meghatározása többféleképpen lehetséges. A legegyszerűbb eljárás, ha erre a mozgó gömbre ható viszkózus ellenállást használjuk. A golyó csapdázása után a mikroszkópasztalt ismert sebességgel mozgatva, a golyóra hat a közegellenállási erő. Ez az erő Stokes $F = 6\pi\eta r v$ törvénye alapján kiszámítható, ahol η a közeg viszkozitása, r a csapdázott gömb sugara, v pedig az áramlás sebessége. Megerve az egyes közegellenállási erőkre az elmozdulást, ezekből k értéke kiszámítható.

DNS molekula tulajdonságainak vizsgálata

A dezoxiribonukleinsav (DNS) a nukleinsavak csoportjába tartozó összetett molekula, amely a genetikai információt tárolja magában. Annyiféle létezik belőle, ahány egyed él a világon. Minden sejtben többféle molekula van, amely kapcsolatba kerül a DNS-sel, különféle feladatot látva el. Van olyan, amely kiolvassa és szállítja a DNS-ben tárolt kódolt információt, mások kijavítják az esetleges hibákat, míg vannak olyanok, amelyek felhasítják a kettős hélixet, lehetővé téve egy másik molekula számára a DNS másolását. Ezek során a DNS molekula nyújtásnak, hajlításnak, csavarásnak van kitéve. E folyamatokban nagyon fontos, hogy milyenek a DNS mechanikai tulajdonságai. Ezek tanulmányozását teszi lehetővé a lézercsipesz azzal, hogy segítségével ezeket a molekulákat egyenként is vizsgálhatjuk, elszigetelve a környezetükben található molekulák hatásától. Természetesen ehhez erőmérés szükséges, amely elvégezhető a fentebb ismertetettek alapján. Azonban méretei miatt, az egész molekula nem csapdázható. Az erőmérés mikrométer átmérőjű műanyag gyöngyök felhasználásával végezhető el. Ezek a gyöngyök kémiai úton bevonhatók olyan anyagokkal, amelyek lehetővé teszik, hogy tapadjanak a molekula végeihez. A molekula egyik végéhez ragasztott gyöngyöt csapdázza a lézercsipesz, a másik végén található mikrogöngyöt a mikroszkóp tárgylemezéhez erősítik, vagy mikropipettával tartják. Elmozdítva a tárgylemezt, vagy a mikropipettát, a DNS-szal megnyúlik, és a gömböt egy kissé kihúzza a csapda középpontjából. (8. ábra). A távolság megméréssel meghatározható, hogy a molekula különböző nagyságú megnyújtásához mekkora erő szükséges.



8. ábra

Motorfehérjék vizsgálata (Molekuláris motorok)

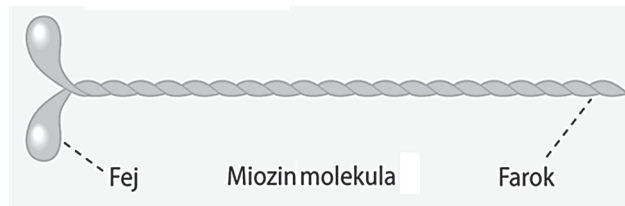
Ma már több olyan fehérje ismert, amelyek biológiai szerepe valamilyen mechanikai hatás gyakorlása. Az ilyen fehérjék képesek mechanikai erőt kifejteni, és irányított elmozdulást létrehozni. Ebbe a családba tartoznak a motorfehérjék, amelyek az izomműködésben, valamint a sejten belüli anyagtranszportban játszanak kulcsszerepet. Olyan különleges fehérjemolekulák, amelyek kémiai energiát képesek átalakítani mechanikai munkává, így hoznak létre elmozdulást és erőkifejtést molekuláris szinten. Az izmokban ezt a szerepet az aktin és miozin tölti be.

Az aktin az izomszövetekben előforduló vékony filamentumnak nevezett fonalas szerkezetű fehérjéknek a legfontosabb alkotó eleme. Ezeket a fonalakat két, egymásra csavarodó aktin rost építi fel, amelyek mindegyike kis, gömb alakú aktinegységekből rakódik össze (9. ábra). A rostok el vannak csúsztatva egymáshoz képest, így a fonalak két vége különbözik egymástól, az egyik a „mínusz”, míg a másik a „plusz” vég.



9. ábra

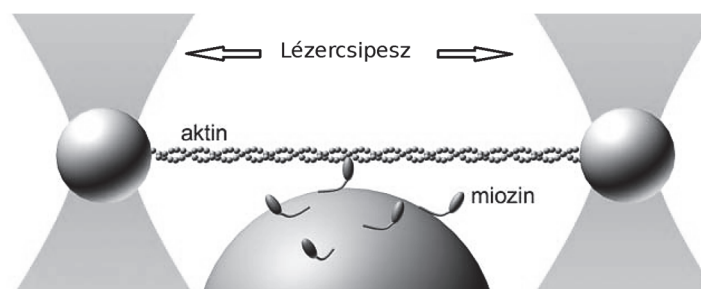
A miozin olyan fehérje, amely kölcsönhatásba tud lépni az aktinnal, és el tud mozdulni ehhez képest, létrehozva a sejtek mozgását és az izom összehúzódását. A miozin molekula egy hosszú „farokból” és egy „fej” részből áll (10. ábra).



10. ábra

Az izomban a hosszú miozin farkak egymással kötegekbe rendeződnek, létrehozva a vastag miozin filamentumot, amelyből oldal irányban állnak ki a miozin molekulák globuláris fejei. Ezek a fejek képesek a vékony filamentum aktinegységeihez kapcsolódni, de ugyanakkor le is válni ezekről. Leválás után, szerkezeti változás eredményeként, egy másik helyen ismét hozzákötődnek egy szomszédos aktinegységhez, s mintegy lépegetve haladnak előre az aktin szálon, mint egy sín mentén. A miozin fejek mozgása, alakváltozása energiaigényes. A szükséges energia az adenozin-trifoszfát (ATP) hidrolíziséből származik, amely az élő sejtek legfontosabb energiaforrása.

A mozgási folyamatok részletes tanulmányozását a lézercsipeszek használata tette lehetővé. Erre általában az ún. „háromgömbös vizsgálat” módszerét használják (11. ábra). Az eljárás során az aktinszál két végét egy-egy mikrogöngyhöz rögzítik, majd ezeket optikai csipesszel ragadják meg, és kifeszítik. Az aktinszál alá egy harmadik, nagyobb, rögzített mikrogöngyöt helyeznek el, amelynek felületére miozin molekulákat adszorbeálnak olyan felületi sűrűséggel, hogy az aktinszálát közelítve, az csak egyetlen miozin molekulával kerüljön kölcsönhatásba. Amint a miozin „lép” egyet, megrántja a filamentumot, és a filamentum végén levő csapdázott mikrogöngy elmozdul az erő irányába. Az elmozdulás nagysága megfelelő detektorok segítségével mérhető, és ebből kiszámítható az egyedi motorfehérjék által kifejtett erő. A módszerrel sikerült meghatározni a miozin lépéshosszát és a húzóerőt. Az egyes kutatócsoportok különböző eredményeket kaptak, kevés eltéréssel, végül az 5 nm-es lépés vált elfogadottá, míg a húzóerőkre 1-10 pN értékeket mértek.



11. ábra

Mesterséges megtermékenyítés

A lézercsipesz egy változatának tekinthető a lézerszike. Felépítése lényegében megegyezik az optikai csipeszével. A különbség csak az, hogy ehhez ultraibolya lézert használnak, melynek fényét a biológiai anyagok nagymértékben elnyelik.

Az ultraibolya sugarakat a mikroszkóp objektívje a kiválasztott mintába fókuszálja. Mivel a fényenergia a fókuszpont közvetlen környezetében koncentrálódik, csak itt roncsolja szét a sejteket alkotó elemeket. Ezzel lehetőség van arra, hogy apró lyukakat, vagy vágásokat ejtsünk a kiválasztott sejten.

A fénycsipesz és a lézerszike együttes alkalmazása megnyitotta az utat a mesterséges megtermékenyítés új módszerének kidolgozására. A szikével előbb lyukat fúrnak a petesejt külső burkába, azután a lézercsipeszrel megragadnak egyetlen kiválasztott spermiumot, amelyet bejuttatnak a vágáson keresztül a petesejtbe. Ezzel az eljárással több olyan esetben is eredményt értek el, amikor más mesterséges megtermékenyítési módszerek nem jártak sikerrel, illetve a korábbiak során alkalmazott, túvel történő megtermékenyítés helyett, a fénycsapda segítségével a hímivarsejt és a petesejt a sérülés kisebb kockázata mellett válik egyesíthetővé. A klinikai gyakorlatban történő alkalmazáshoz azonban további kutatásokra van szükség. Meg kell győződni arról, hogy a lézerek használata nem befolyásolja a születendő gyermek egészségét, fejlődését.

Az előzőekben csak néhány lézercsipeszrel végzett kísérletet mutattunk be vázlatosan. Az ismertetett példák messze nem merítik ki az Ashkin által feltalált lézercsipesz felhasználási lehetőségeit és a tudományos kutatások területén betöltött forradalmi szerepét, de talán elégséges, hogy meggyőződjünk arról mennyire megérdemelte Ashkin a Nobel-díjat.

Könyvészet

1. Ashkin, A., Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. 1997. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 4853-4860
2. Ashkin, A., Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. 1992. Biophys.J. 61, 569-582
3. Galajda, P., Mikroszkópikus testek orientációja és forgása lézercsipeszben. Doktori értekezés, 2002, MTA Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet.
4. Fonyó, A., Az orvosi élettan tankönyve. 7. Fejezet, Medicina Könyvkiadó Zrt. 2011.

Karácsony János