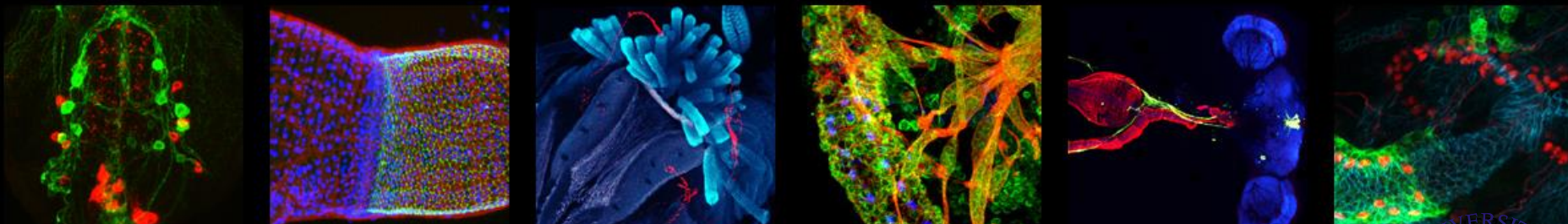


Konfokální mikroskopie a nové trendy ve fluorescenční mikroskopii

RNDr. Jan Škoda (přednáší Mgr. Blanka Jančková)
Ústav experimentální biologie PŘF MU



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Program přednášky

- Historie a princip konfokálního mikroskopu
- Typy konfokálních mikroskopů
- Dvoufotonový (multifotonový) mikroskop
- Možnosti zobrazení
- Rozlišení a dekonvoluce
- Superrozlišovací mikroskopie
- Lightsheet fluorescence microscopy a TIRF

Konfokální mikroskop



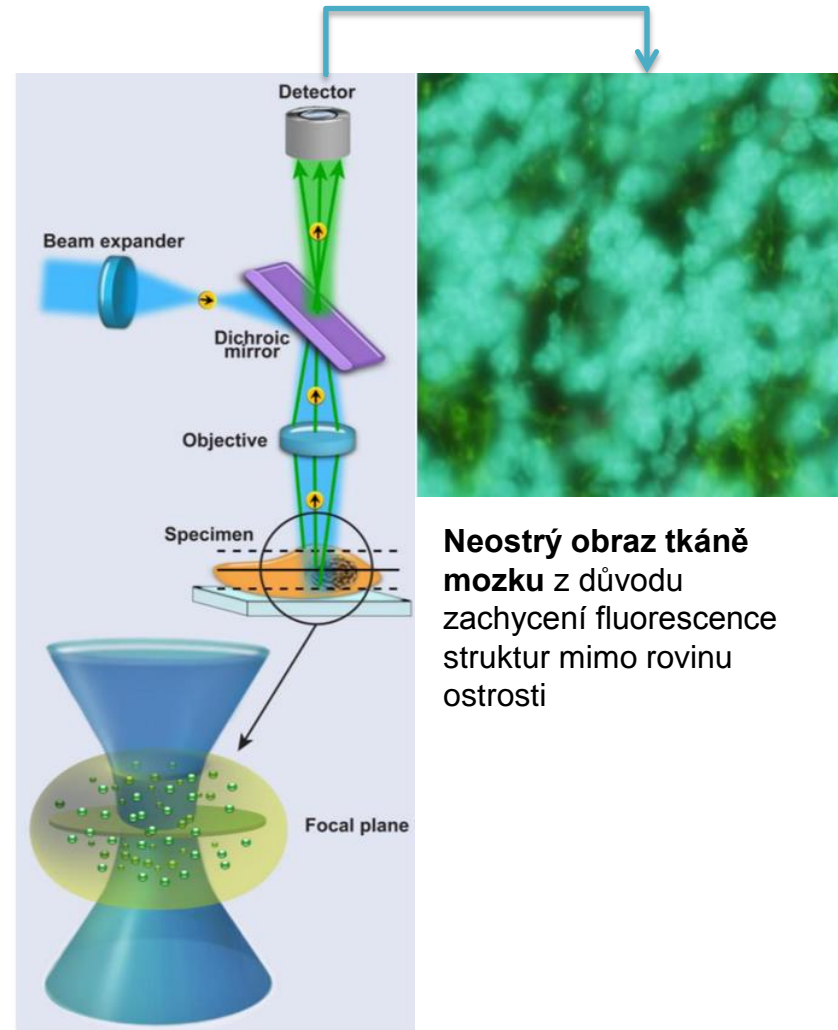
Marvin Lee Minsky

(9. srpna 1927 – 24. ledna 2016)

- kognitivní vědec; studium umělé inteligence
- studium nervových sítí v mozku
- snaha zaznamenávat děje v živých tkáních

ALE JAK?

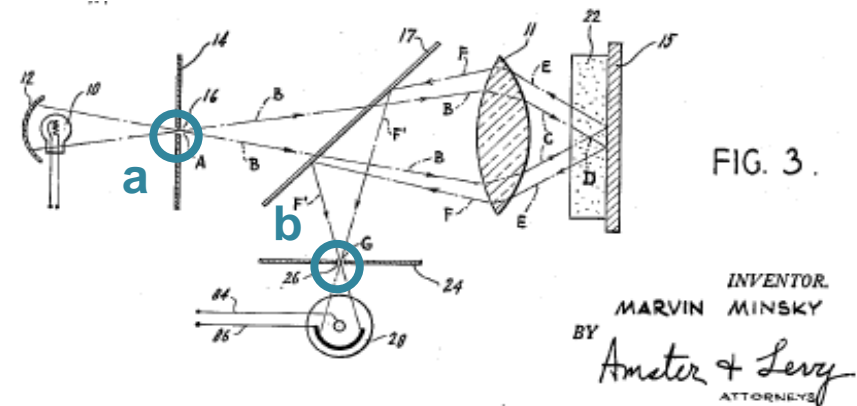
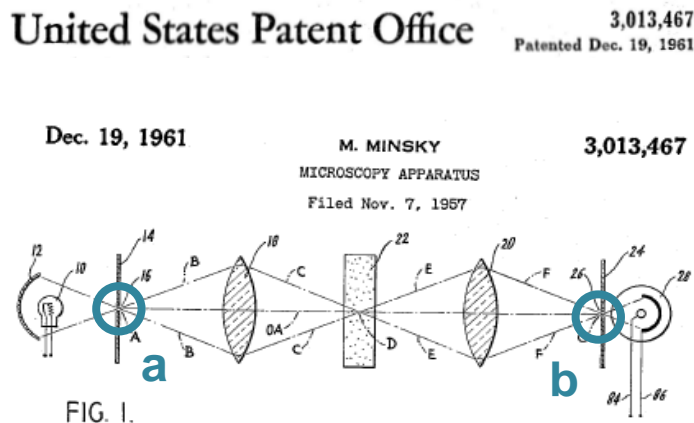
Standardní (widefield) fluorescenční mikroskop



Neostrý obraz tkáně mozku z důvodu zachycení fluorescence struktur mimo rovinu ostrosti

Konfokální mikroskop

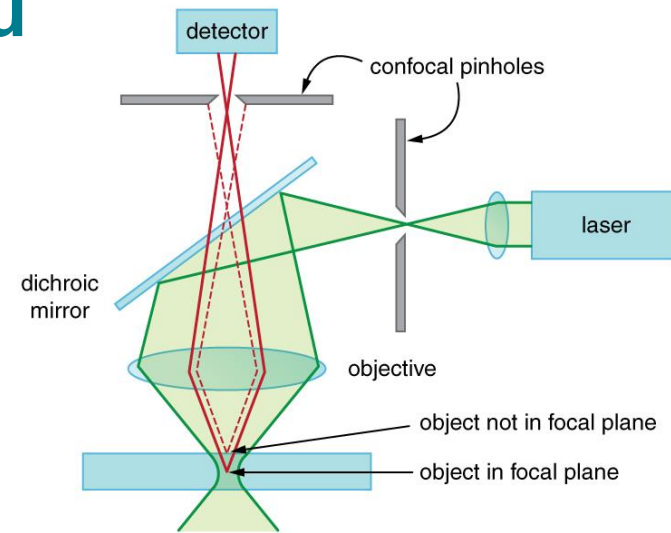
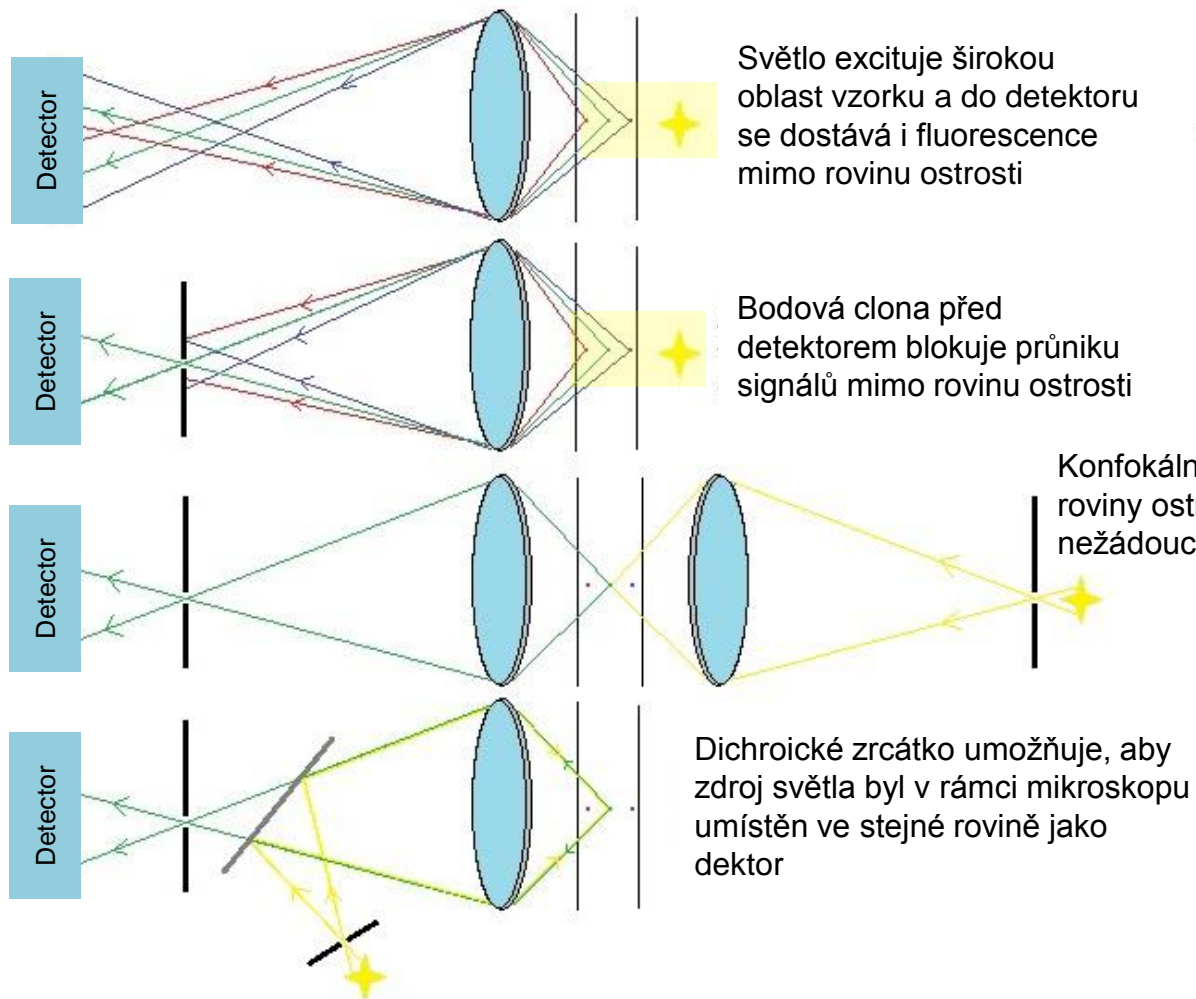
- 1955 – Marvin Minsky sestrojil **první konfokální mikroskop** (1961 patent)



<http://www.google.com/patents/US3013467>

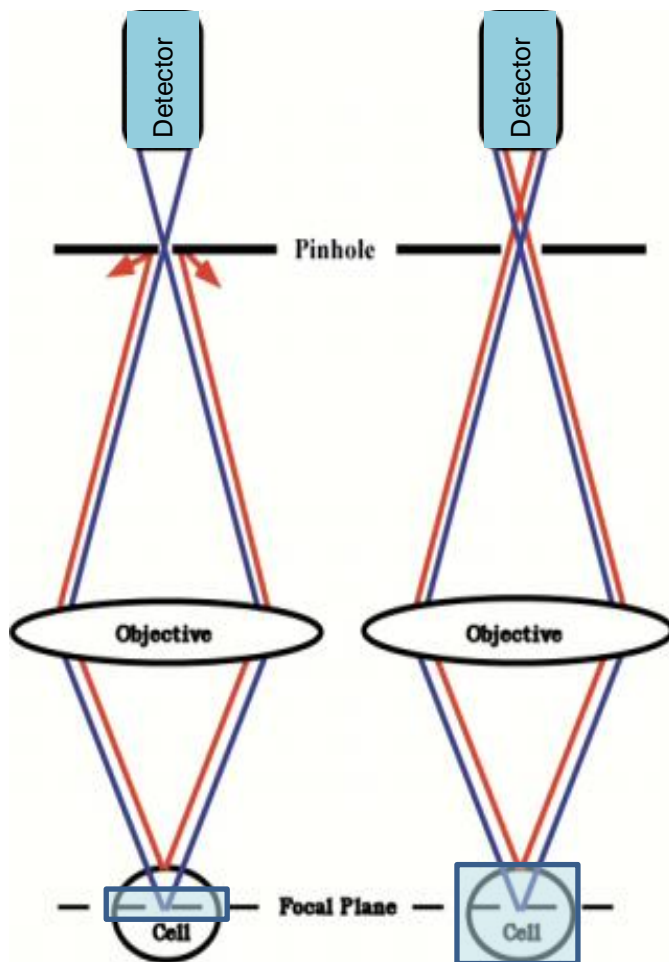
- základem **2 konfokální bodové clonky** (pinhole apertures)
 - a) před zdrojem světla → úzký paprsek světla (světlo do konkrétního bodu)
 - b) před detektorem → propustí pouze zaostřené světlo (na úzkou rovinu)
- navržení konstrukce i pro odražené (emitované světlo)

Princip konfokálního mikroskopu



Obě bodové clonky –
tzv. **konjugovaných rovinách ostrosti**
(současně zaostřené)

Tloušťka optického řezu – průměr bodové clonky



Rozlišení v ose Z = tloušťka optického řezu závisí na:

- vlnové délce excitace/emise ($R_{x-y} = \lambda/2NA$)
- numerické apertury objektivu
- indexu lomu komponent v optické dráze
- průměru bodové clonky (pinhole) → ve většině konfokálních mikroskopů nastavitelná velikost clony
- $R_z \sim$ asi 2x větší než R_{x-y}

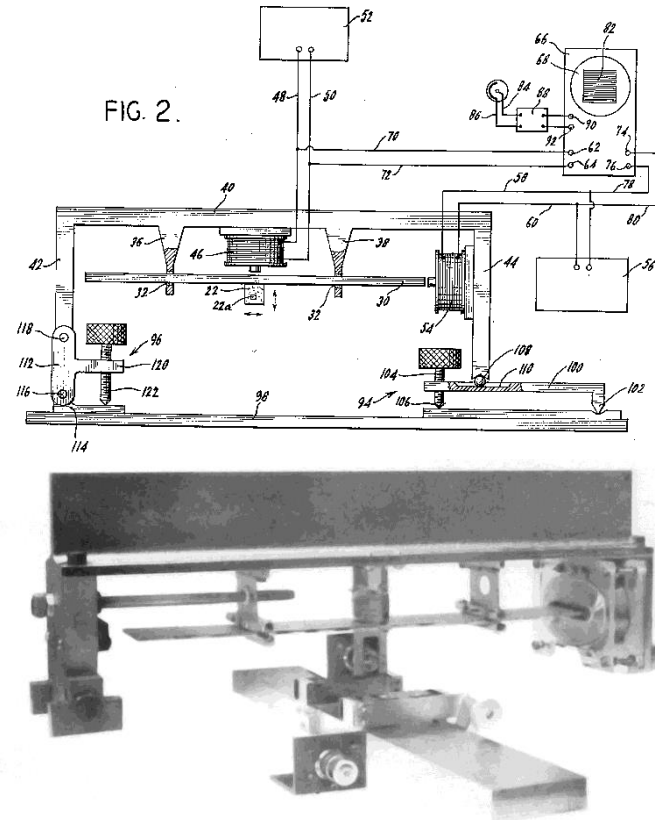
Malý průměr bodové clonky – propouští signály z tenkého řezu → (+) z jiných rovin jsou signály odfiltrovány; (-) prochází minimum světla

Velký průměr bodové clonky – (+) vyšší intenzita signálu; (-) propouští signály v rovině ostrosti i mimo ni

Konfokální mikroskop dle Marvina Minsky

Memoár Marvina Minsky: <http://web.media.mit.edu/~minsky/papers/ConfocalMemoir.html>

- omezení neostrého signálu
 - zvýšení signálu proti pozadí
 - zvýšení rozlišení
 - mikroskopie silných a členitých preparátů s dostatečným rozlišením
 - × neměl k dispozici vhodný (výkonný) zdroj světla
 - × celkový obraz (složení jednotlivých bodů) vytvářen pomocí pohybu stolku s preparátem
- × počítače nebyly dostatečně výkonné a dostupné – obraz byl promítán skrze armádní radar (bez záznamu; snímek zobrazen 10s, pak nový sken)



Snímání vzorku – tvorba výsledného obrazu

Z uspořádání mikroskopu vyplývá, že v jednom kroku získáme informaci pouze o jednom bodu (velmi omezené oblasti) – pro získání obrazu celé roviny je nutné detekovat sérii signálů z dané roviny.

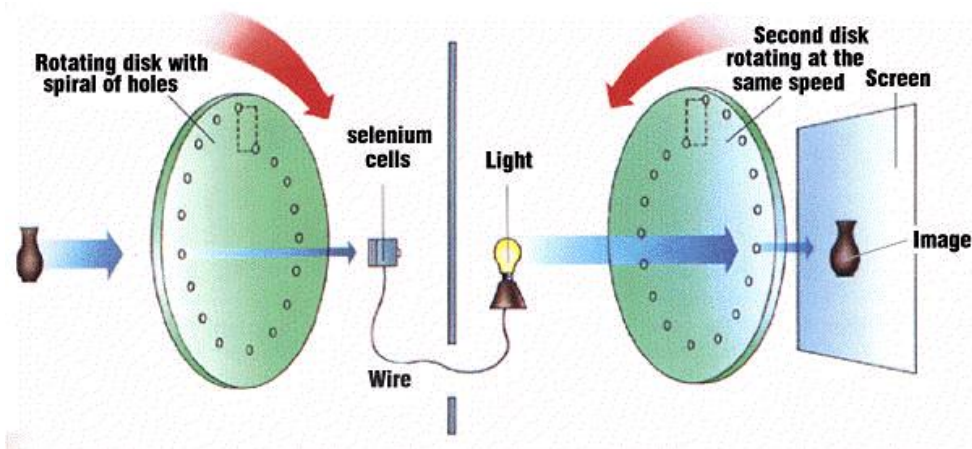
3 možnosti snímání vzorku

- a) pohybuje se vzorek (Minsky)
- b) pohybuje se objektiv (David Egger a Paul Davidovits; doi:10.1038/223831a0)
- c) **pohybuje se paprsek světla** – (skenování, rastrování)
 - multiple-beam scanning – na bázi Nipkowova disku
 - single-beam scanning – laserový skenovací konfokální mikroskop

Konfokální mikroskop na bázi rotujícího Nipkowova disku

Paul Nipkow (1860–1940)

- německý inženýr polského původu
- snímání a rozklad obrazu pomocí rotujícího disku
 - po obvodu opatřen otvory umístěnými ve spirále
 - vyžaduje 1 snímací fotočlánek
 - 1884 patentoval
 - 1925 byl Nipkowův disk použit pro první (mechanickou) třicetiřádkovou televizi (5 snímků/s)

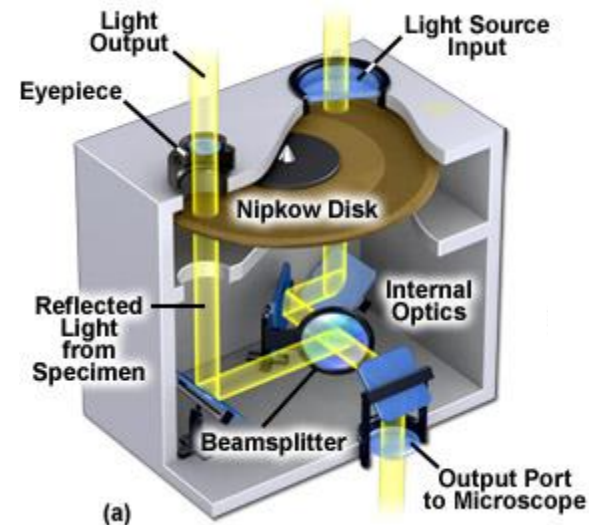
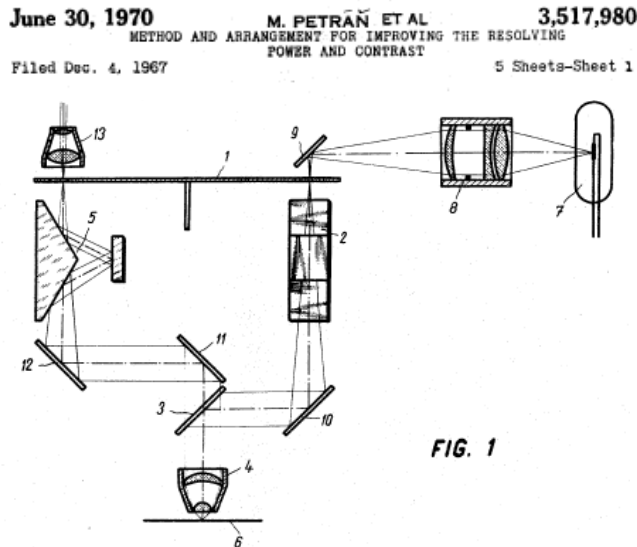


Konfokální mikroskop na bázi rotujícího Nipkowa disku

Spinning Disk Confocal Microscopy

prof. Mojmir Petráň (28. března 1923) [shlédnout dokument ČT](#)

- profesor biofyziky; působil na Lékařské fakultě UK v Plzni
- modifikace Nipkowa disku pro optickou mikroskopii a zároveň zajišťující konfokální efekt → [Tandem-Scanning-Microscope](#)
- v roce 1967 patentoval v USA se spolupracovníkem Milanem Hadravským
- 1968 – výroba v rámci JZD Komorno u Plzně v jednotkách kusů



- redukce velikost disku i otvorů; zvýšení počtu otvorů z desítek na tisíce
- na zorné pole prochází světlo asi z 1000 otvorů
- při rotaci jsou pokryty prostory původně neosvícené → vykrytí celého zorného pole
- rychlost až 1000 (2000) snímků/s

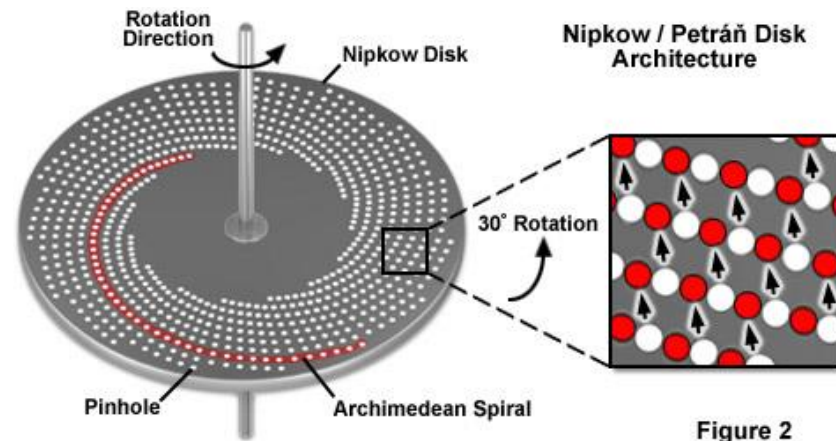


Figure 2

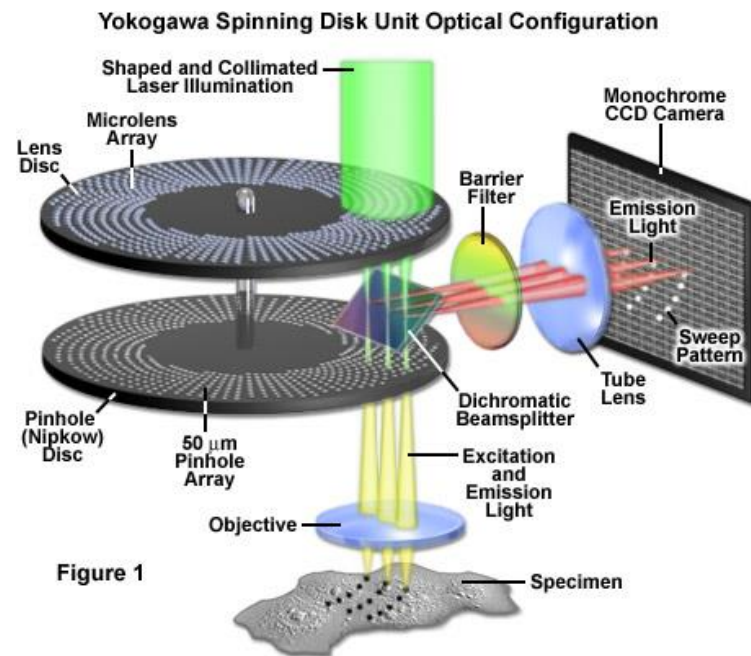
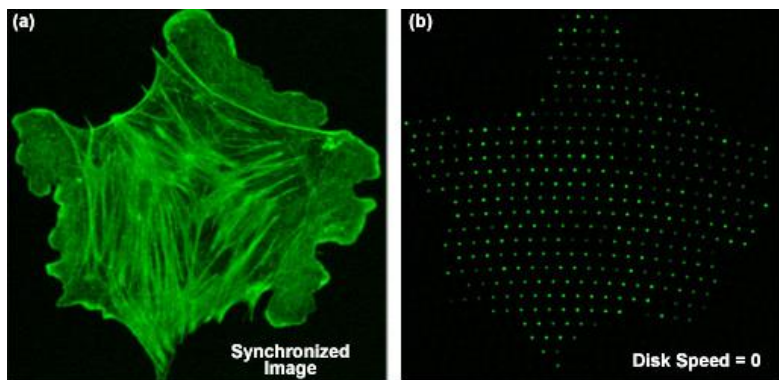
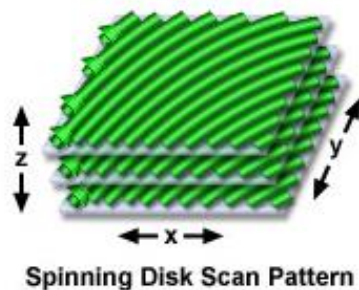
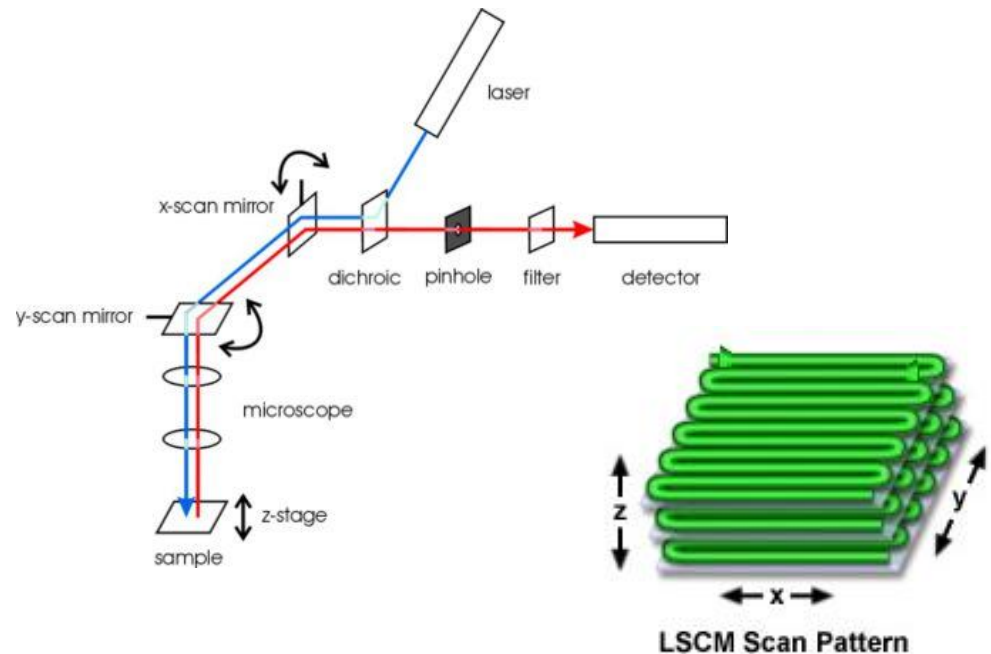
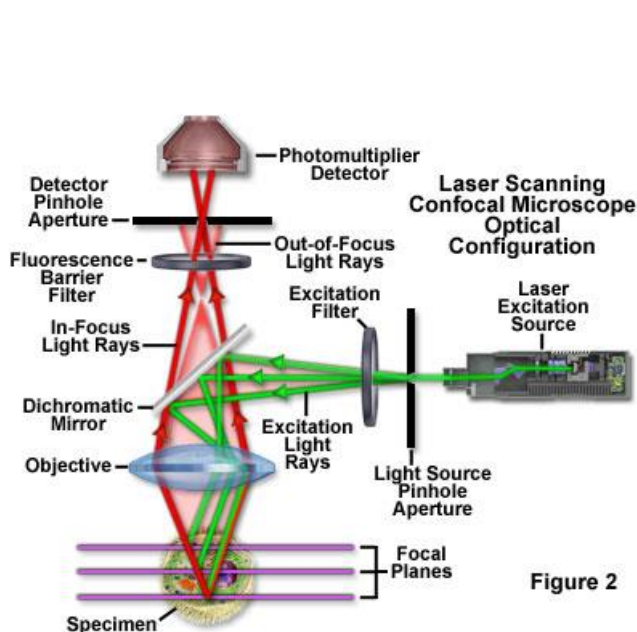


Figure 1

Laserový skenovací (rastrovací) konfokální mikroskop (LSCM)

Laser Scanning Confocal Microscope

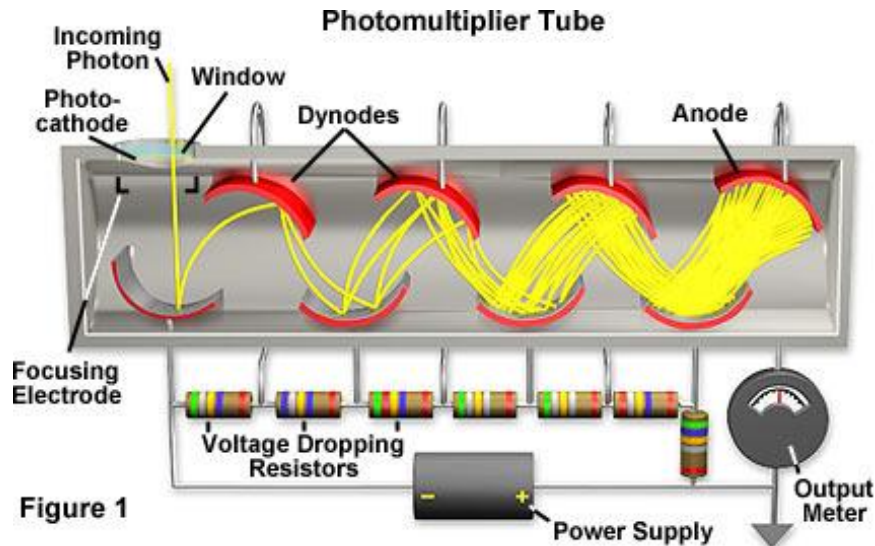
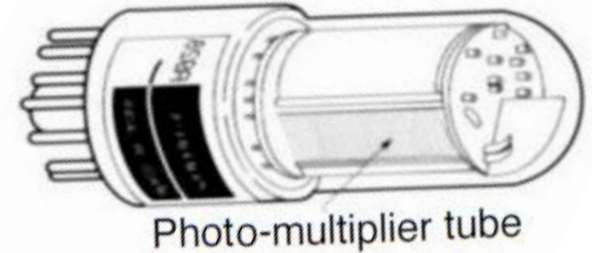
- rozvoj od konce 70. let 20. století
- rastrování probíhá rozmítáním (posunem) paprsku pomocí natáčecích zrcadel – umístěny mezi dichroické zrcadlo a objektiv
- snímání všech bodů roviny (princip jako pohyb po stínítku televize)
- rychlost maximálně 30 snímků/s



Detekce signálu u LSCM

Fotonásobič (photo-multiplier tube, PMT)

- citlivý detektor světla (UV, VIS, near IR)
- zesiluje signál přinášený světelným paprskem (fluorescence z preparátu)



Princip fotonásobiče

- konverze fotonu na elektron (fotokatoda)
- znásobení elektronů (dynody)
- detekce signálu – proudu (anoda)

Srovnání LSCM a konfokální mikroskopie na bázi rotujícího disku

LSCM

Nutnost snímat obraz bod po bodu → delší doba rastrování = max. 30 snímků/s

Fotonásobič schopný detekovat pouze 15–45 % fluorescence = zvýšení rychlosti skenování snižuje množství fotonů, které dopadnou na fotonásobič a tím zvyšuje šum ve výsledném obrazu → nutno využít vyšší excitační energii laseru

Postupné snímání bodů → lepší axiální rozlišení (v ose Z)

Snadno lze využít metody FRAP, fotoaktivace a fotokonverze

→ Výhodné pro kolokalizační studie

Nipkowův disk

V jednom okamžiku snímáno více bodů → obraz rastrován 100–1000krát rychleji

Obraz rastrován otvory v disku paralelně – ve stejném čase (v porovnání s LSCM) je naskenováno více bodů obrazu (i opakovaně) → lze využít nižší intenzity osvětlení = nižší vysvícení (photobleaching) preparátu, nižší fototoxicita

„Pinhole crosstalk“ – průchod odraženého světla skrze sousední otvory v disku → zvýšené pozadí pro tlusté vzorky a snížení axiálního rozlišení

Nutno zabudovat přídatný polohovatelný laser pro lokální vysvícení/aktivaci fluoroforů

→ Výhodné pro life imaging, zejména dynamických procesů

Moderní konfokální mikroskopie

- zdroj světla – laser
- detektor: CCD kamera, fotonásobič
- obraz tvořen v PC
 - zaznamenaná intenzitu signálu a polohu bodu
 - v rastru naskenována jedna rovina preparátu, posun do jiné roviny
 - software umožňuje skládání obrazů (velké objekty v ose X-Y; tlusté objekty v ose Z)
 - 3D a 4D projekce

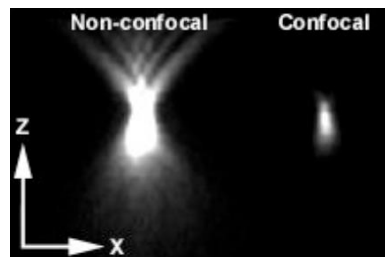
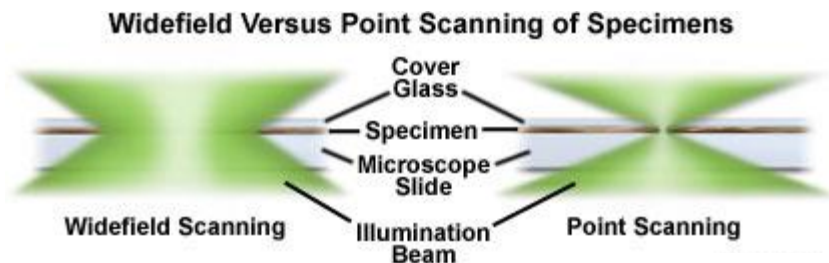


Konfokální mikroskop Nikon A1+



Konfokální mikroskop Olympus FluoView FV1200

Srovnání konfokálního a standardního (widefield) mikroskopu



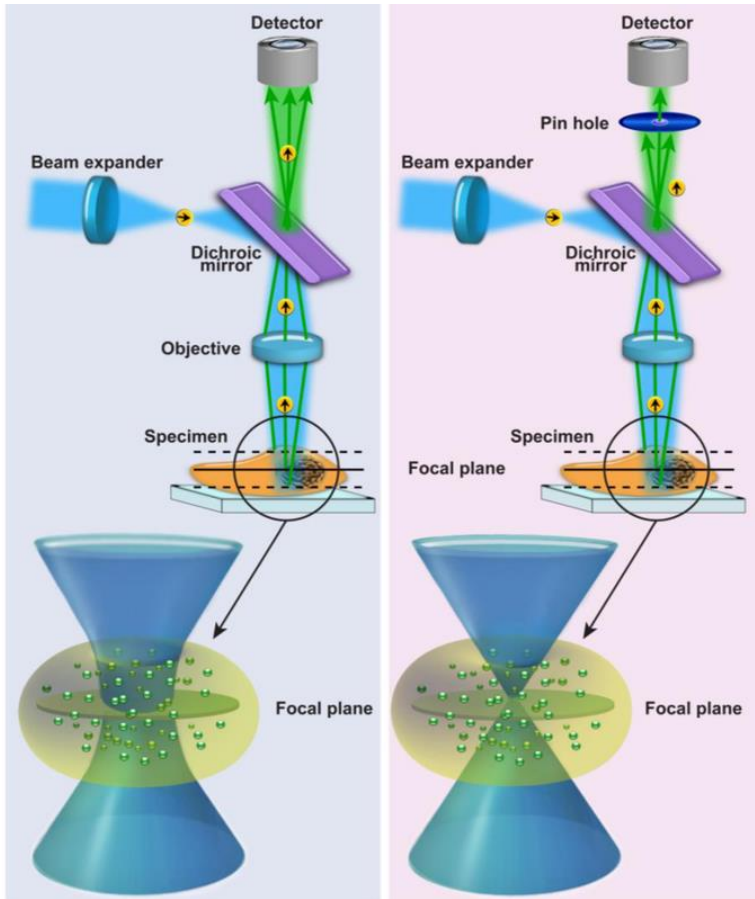
Standarní fluorescenční mikroskop

- vznik fluorescence i v oblastech vzorku, který je mimo zaostření – interferuje s fluorescencí v místě zájmu
- platí pro preparáty tlustější jak $2\mu\text{m}$
- celý vzorek ozářen – celé zorné pole lze sledovat nebo zaznamenat (kamera)
- rozlišení v ose Z: $2\text{-}3\ \mu\text{m}$

Konfokální fluorescenční mikroskop

- omezení signálu který je mimo rovinu ostrosti → zvýšení rozlišení
- jeden nebo více světelných paprsků „skenuje“ plochu zorného pole
- získání optického řezu = 1 obrázek z dané roviny zaostření
- lze tedy zaostřit do jakékoliv roviny buňky (objektu) bez fyzického řezání
- automatické získání obrazů z více rovin - tvorba 3D obrazu
- optické rozlišení v ose Z: $0,5\mu\text{m}$

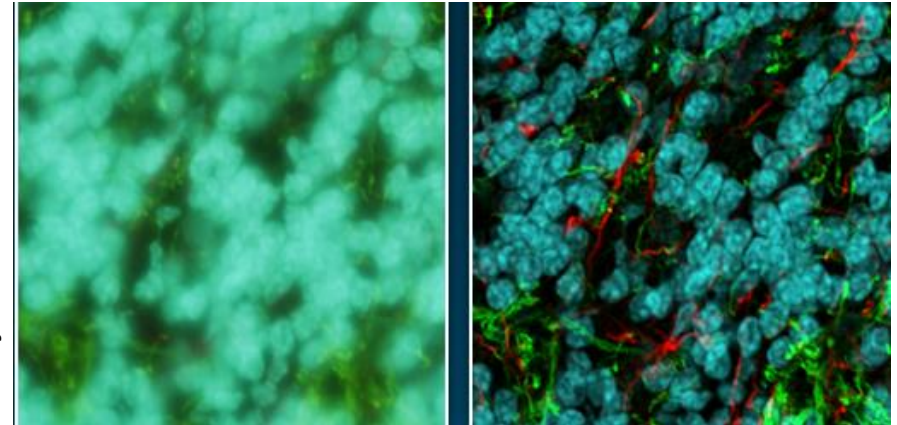
Srovnání konfokálního a standardního (widefield) mikroskopu



Standardní fluorescenční mikroskop

Konfokální mikroskop

Myší mozková tkáň



Standardní fluorescenční mikroskop

Konfokální mikroskop

Výhody konfokální mikroskopie

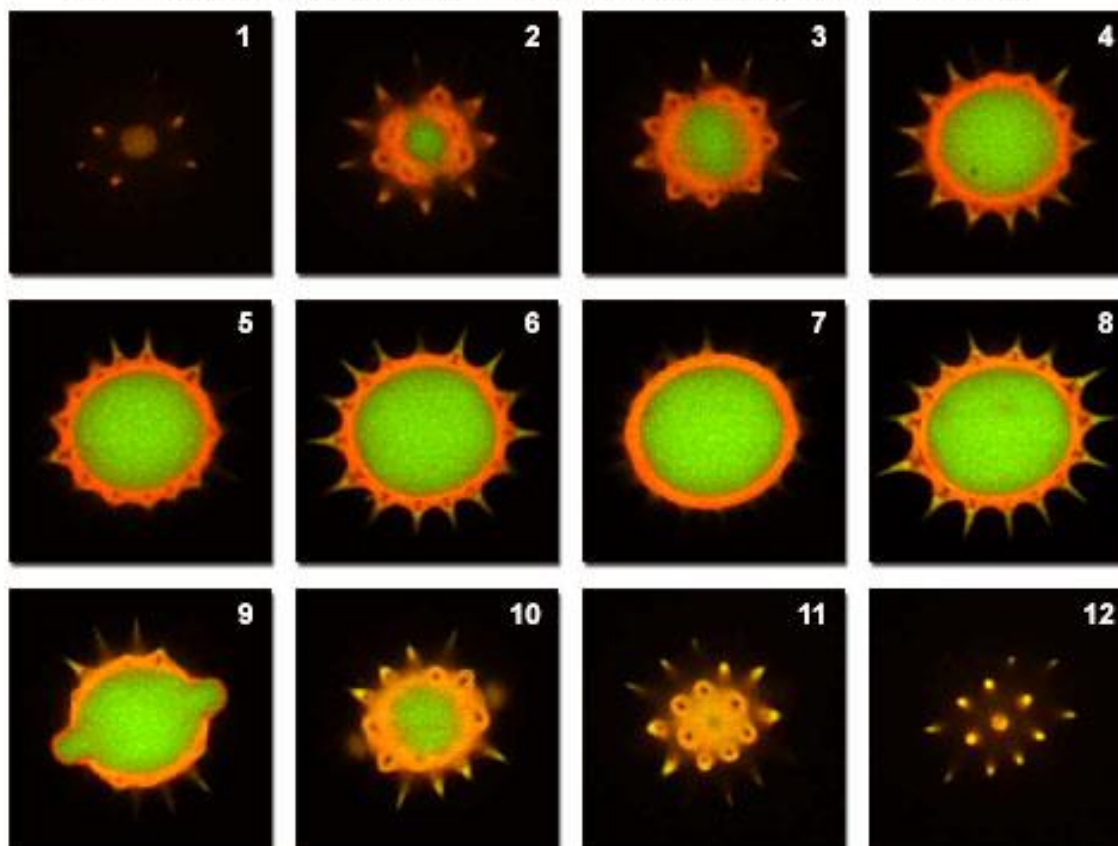
- vymezená hloubka ostrosti – možnost snímání optických řezů vzorkem
- eliminace signálu (jasu) z rovin mimo zaostření
- lze snímat objemnější živé objekty

[Online tutoriál 1](#)

Možnosti zobrazení

- 1 optická rovina (řez)

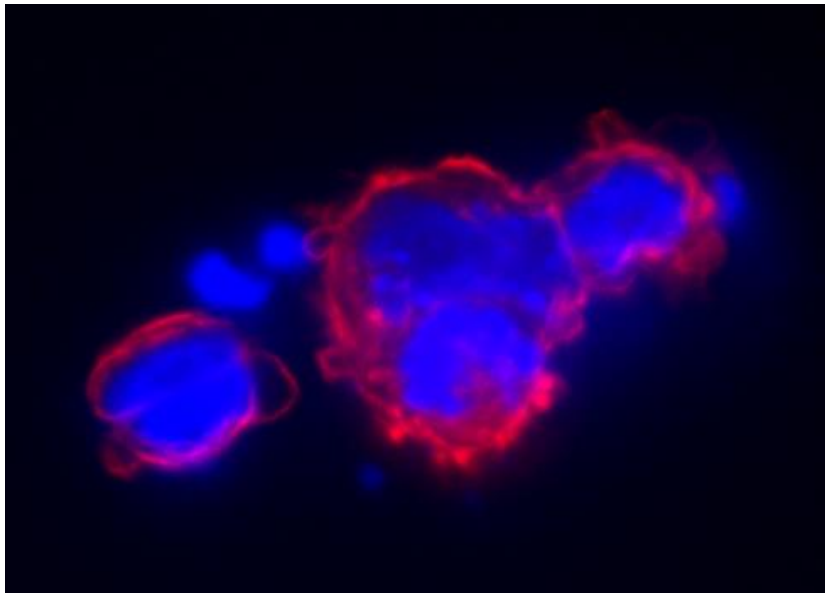
Pollen Grain Serial Optical Sections by Confocal Microscopy



Možnosti zobrazení

Z-Serie a 3D zobrazení

- sekvence optických řezů z různých rovin kolmých na osu Z
- skládání řezů při postupném posouvání preparátu v ose Z
- krok a celkovou hloubku posunu lze navolit
- řezy lze softwarově sečíst nebo spojit v animaci

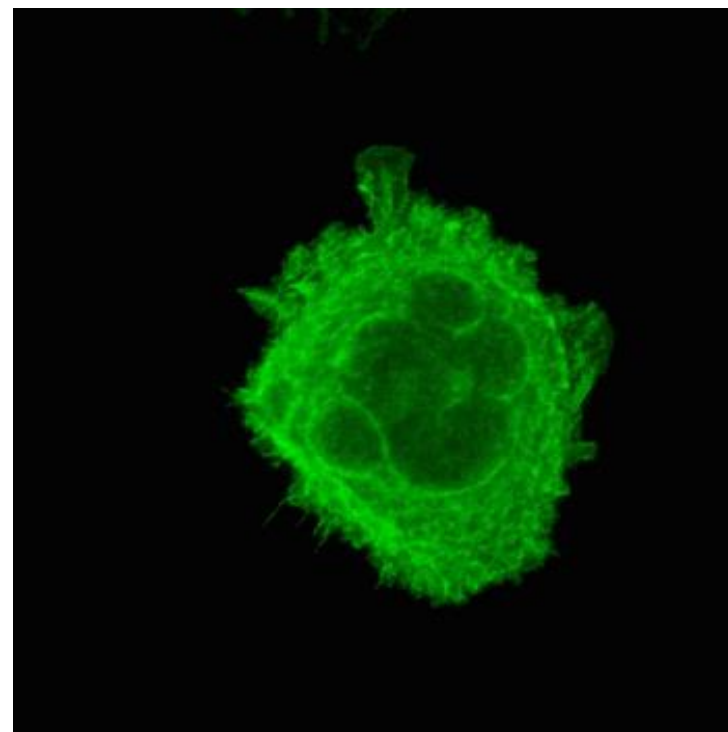
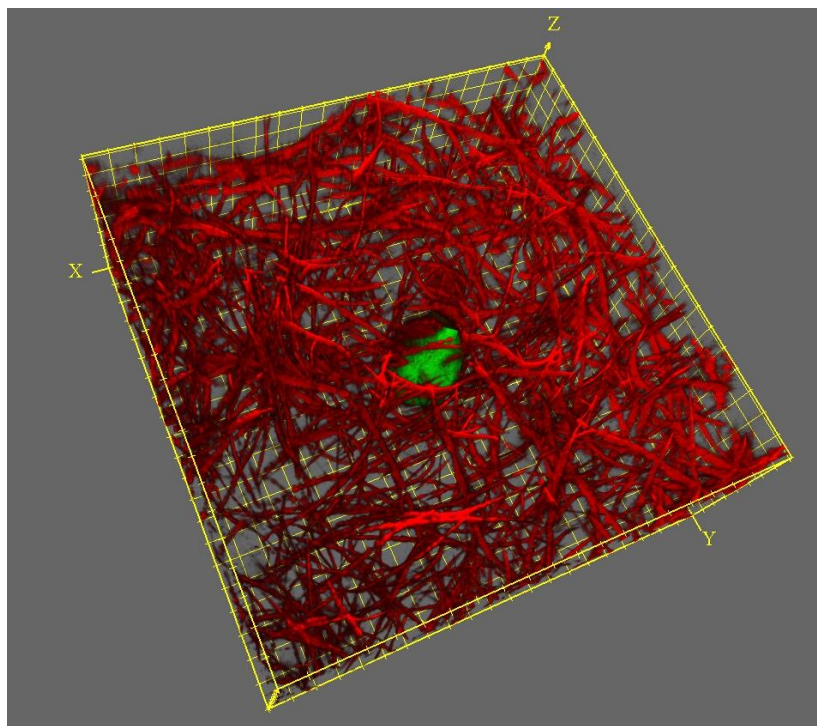


apoptotické buňky linie P19,
modrá: DAPI; červená: phalloidin-TRITC

Možnosti zobrazení

3D zobrazení

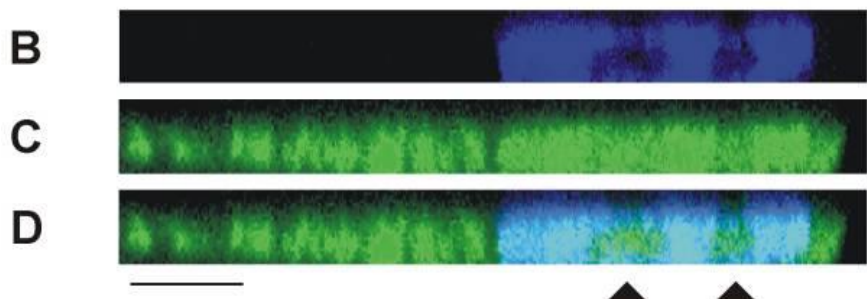
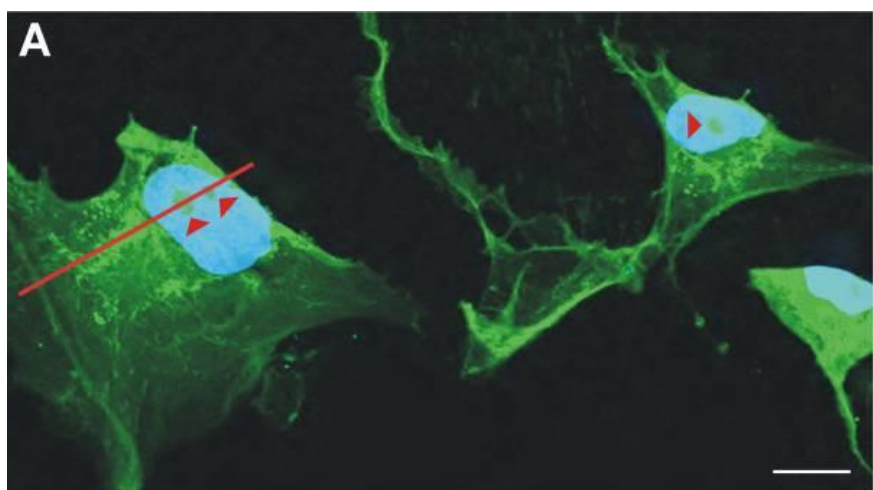
- optické řezy z různých rovin kolmých na osu Z
- tvorba 3D snímku



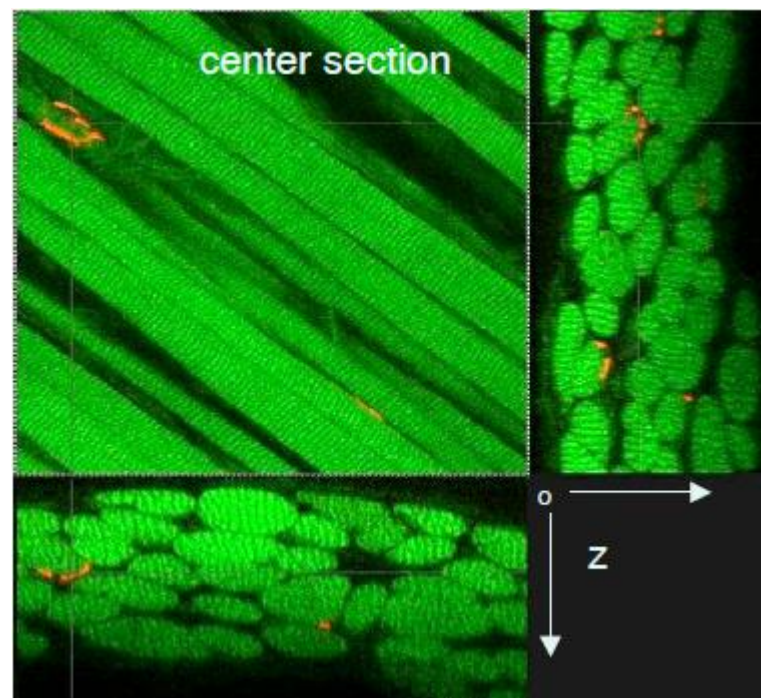
Možnosti zobrazení

X-Z, Y-Z zobrazení

- s použitím optických řezů lze vidět preparát „z boku“



detekce nestinu v buňce glioblastomu



svalová vlákna

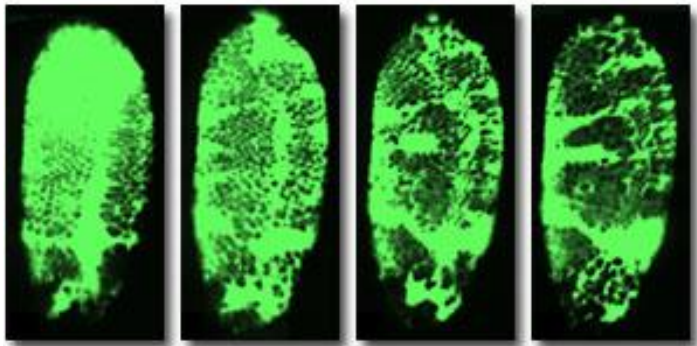
Možnosti zobrazení

časoběrné snímání a zobrazení živých buněk (objektů), 4D

- rozdíly mezi živým a fixovaným objektem

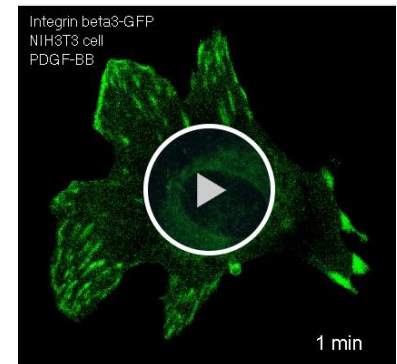
Criteria	Fixed Cells	Living Cells
Limits of illumination	Fading of fluorophore	Phototoxicity and fading of dye
Antifade reagent	Phenylenediamine, etc.	NONE!
Mountant	Glycerol ($n = 1.51$)	Water ($n = 1.33$)
Highest NA lens	1.4	1.2
Time per image	Unlimited	Limited by speed of phenomenon; light sensitivity of specimen

Time-Lapse Imaging



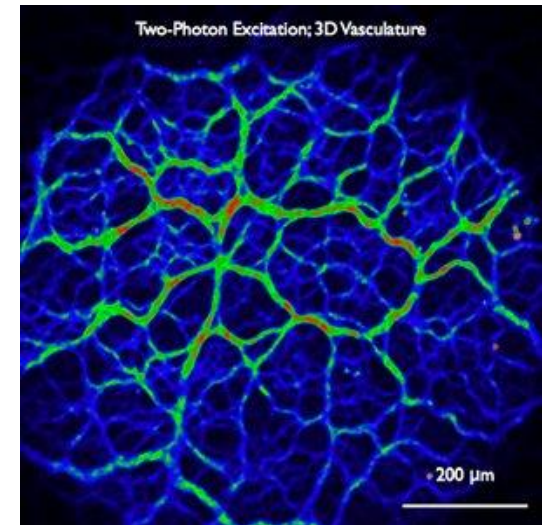
Živé embryo

D. melanogaster po injekci calcium green – změny distribuce v čase



Multifotonová fluorescenční mikroskopie

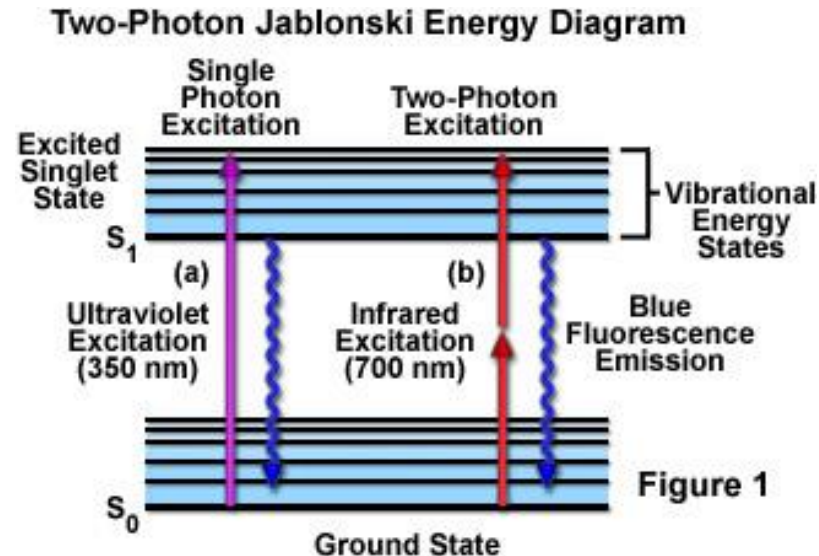
- **Pozorování vzorků s velkou optickou hloubkou - řezy tkání** (Pozorování nervových sítí, mikrovaskulatury atp., in vivo studie, excitace jednotlivých organel)
- Metoda podobná konfokální mikroskopii (hardware, detektor)
- Infračervený pulsní laser - **excitace fotony s nižší energií** (větší vlnová délka světla) = **menší poškození vzorku**
- Biologický materiál lépe absorbuje světlo o větší vlnové délce – fotony pronikají hlouběji
- dvufotonová: využívá současné absorpce 2 fotonů k excitaci fluorochromu
- třífotonová: využívá současné absorpce 3 fotonů



Dvoufotonová fluorescenční mikroskopie

Základním principem je **excitace dvěma fotony** o větší vlnové délce a nižší energii

- energie dodaná fluorochromu současnou absorpcí dvou fotonů o dané vlnové délce → excitace 1 elektronu
- současně = v intervalu 10^{-18} s
- 2 excitační fotony mají přibližně dvakrát větší vlnovou délku a poloviční energii** jako jednotlivý foton schopný vyvolat excitaci fluorochromu
- pravděpodobnost absorpce 2 fotonů fluoroforem je velmi nízká → nutná vysoká denzita fotonů (1.000.000x vyšší než současně = v intervalu 10^{-18} s
- vyžaduje vysoce účinný pulsní IR laser (např. titan-safírový) = **drahé**



Dvoufotonová fluorescenční mikroskopie

- excitace fluoroforu zejména v místě zaostření paprsku laseru (je zde vyšší pravděpodobnost absorpce 2 fotonů než v místech, kde je paprsek více rozptýlený)
- excitace je lokalizována do velmi malého bodu (1 femtolitr = 10^{-15} l)
 - To snižuje fototoxicitu
 - nedochází tak k rychlému vysvícení v celé hloubce preparátu
- **omezení nezaostřeného obrazu = není potřeba bodová clona**
- snímání signálu pomocí fotonásobiče
- jeden snímaný bod = 1pixel (voxel)

Emise fluorescence v ose Z v rámci preparátu

- a) dvoufotonový mikroskop (v místě zaostření)
- b) konfokální mikroskop (v celé hloubce preparátu)

Fluorophore Excitation in Multiphoton Microscopy

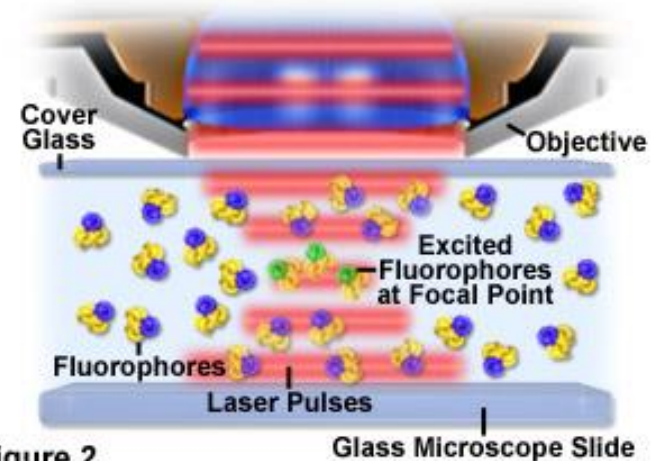
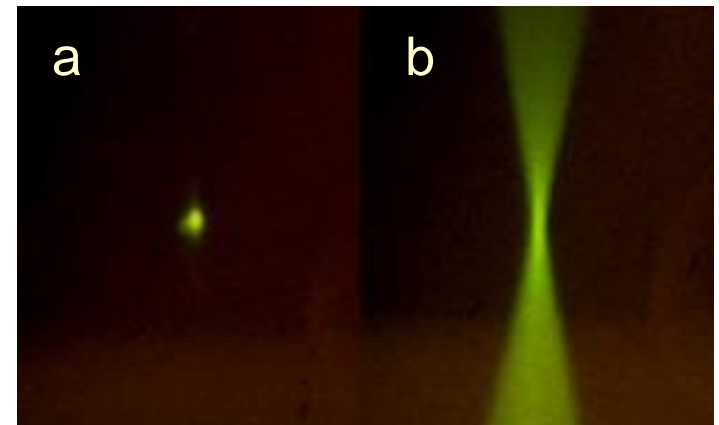
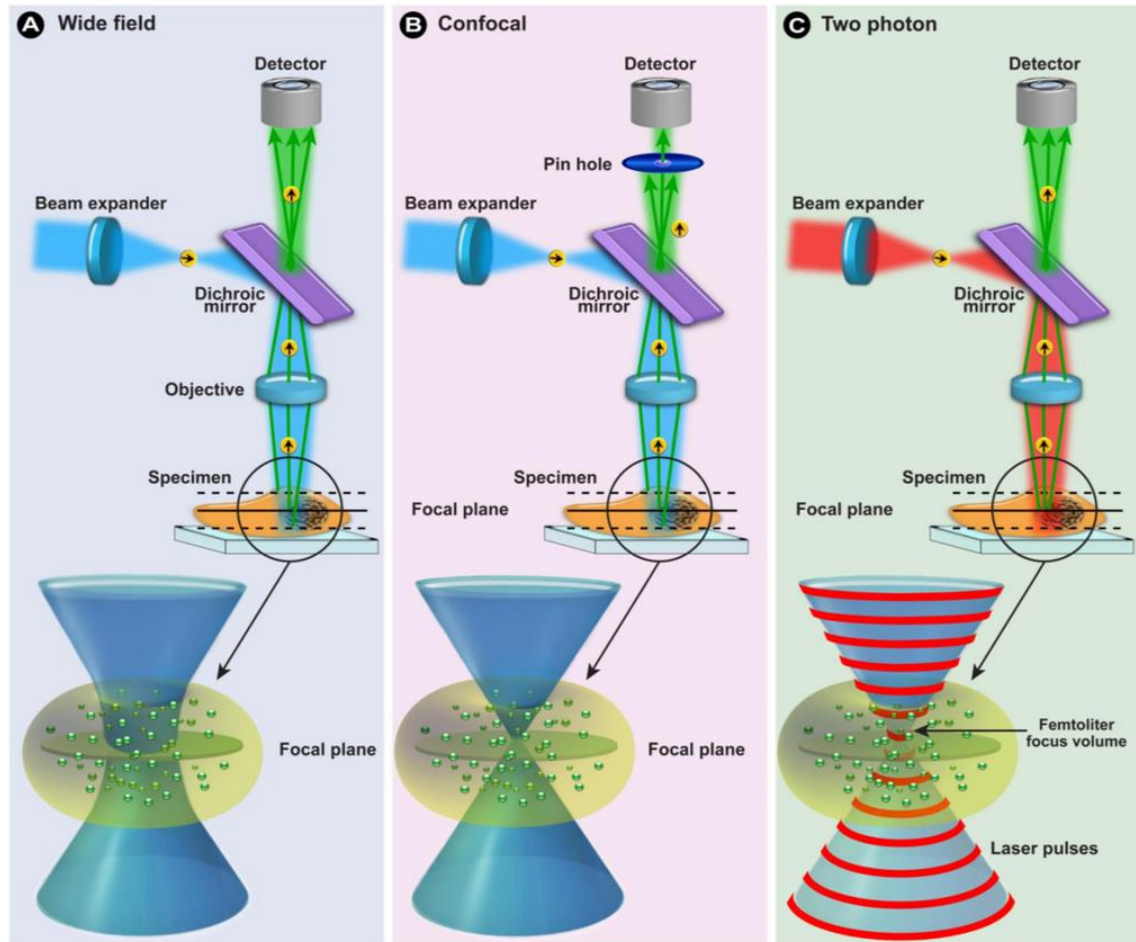


Figure 2

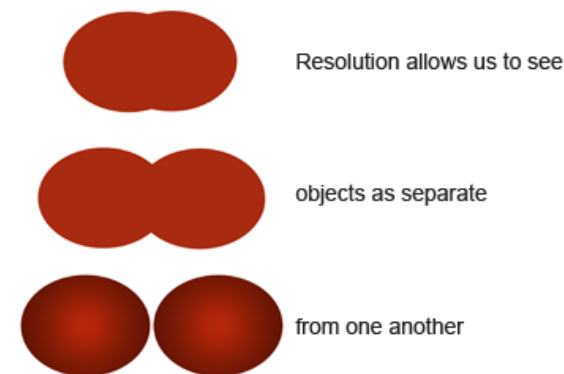


Wide-field vs. Confocal vs. Two-photon (Multi-photon)



Optické rozlišení (difrakční limit)

- taková vzdálenost dvou bodů objektu, kdy je ještě rozlišíme jako samostatné, tzn. nesplynou v jeden bod.

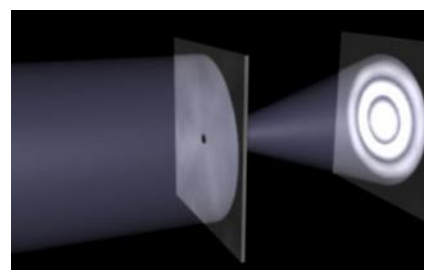


Rozlišení mikroskopu ovlivňují:

- **difrakce světla** - ohyb světla na štěrbíně nebo překážce
- numerická apertura
- kondenzor
- vady čoček

Difrakce světla

- jev odchýlení světla od přímočarého směru šíření, které není způsobeno odrazem, či lomem
- vzniká při průchodu světla optikou mikroskopu
- ovlivňuje výsledný obraz (konvoluce)
- optické rozlišení (difrakční limit) závisí na vlnové délce



Diffrakce koherentního laserového světla

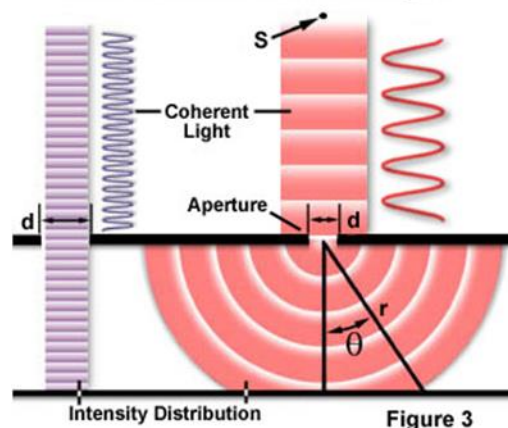
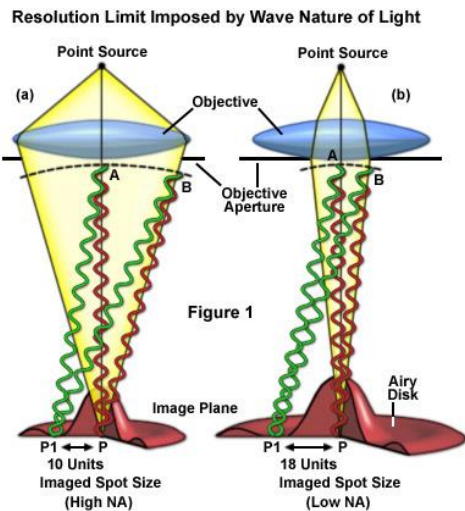
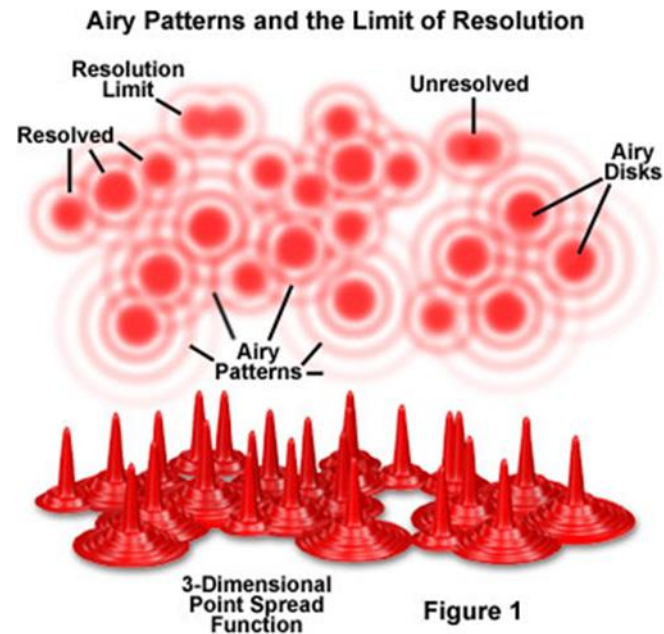


Table 2 - Resolution versus Wavelength

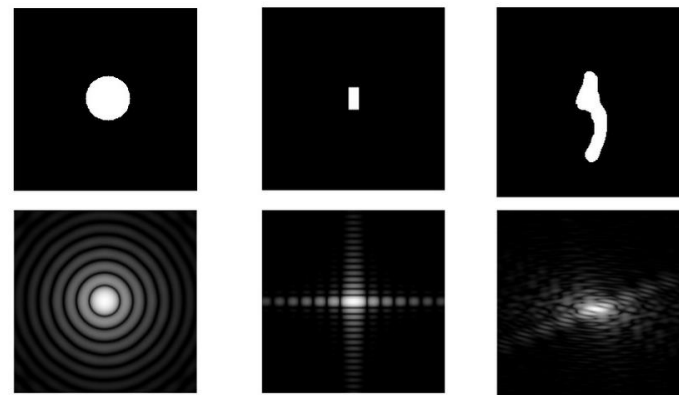
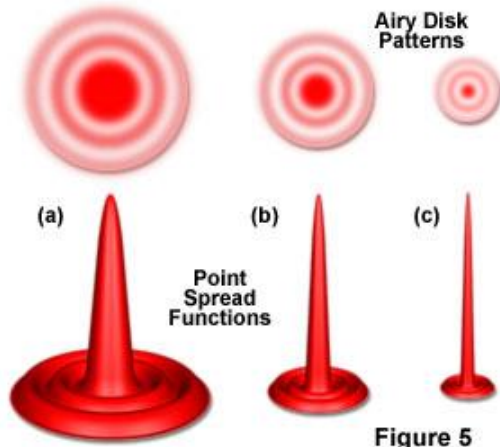
Wavelength (Nanometers)	Resolution (Micrometers)
360	.19
400	.21
450	.24
500	.26
550	.29
600	.32
650	.34
700	.37

Rozptylová funkce (point spread function, PSF)

- popisuje tvar, do něž se v mikroskopu vykreslí bodový zdroj světla.
- při zobrazení v ploše ji popisuje Airyho funkce
- Sestává se z nejintenzivnějšího maxima prvního řádu, okolo něž jsou výrazně méně intenzivní maxima vyšších řádů, tzv Airyho disky
- Obraz, který pozorujeme v mikroskopu, je konvolucí („kombinací“) signálu pozorovaného objektu a rozptylové funkce, která je důsledkem difrakce světla

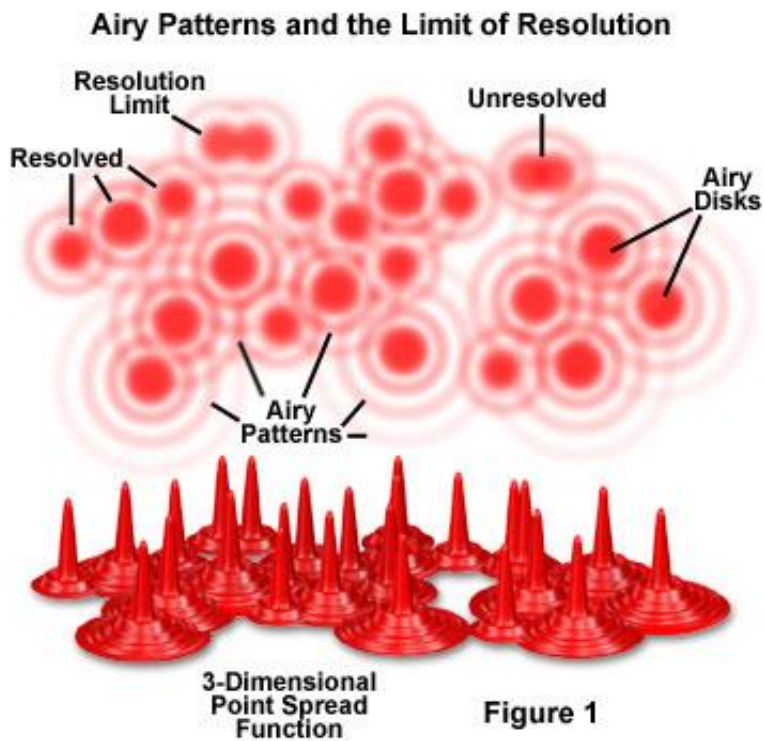


Airy Disk Patterns and PSFs from Diffraction



Konvoluce – praktické dopady

Airyho disky limitují rozlišení jednotlivých bodů v mikroskopu

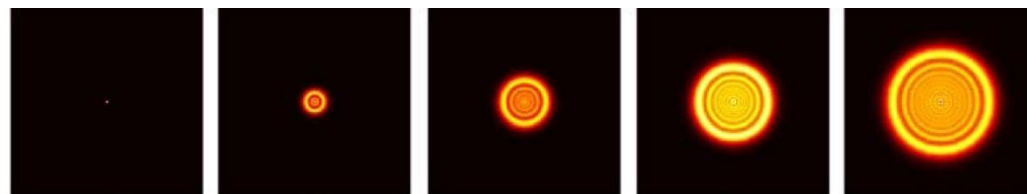
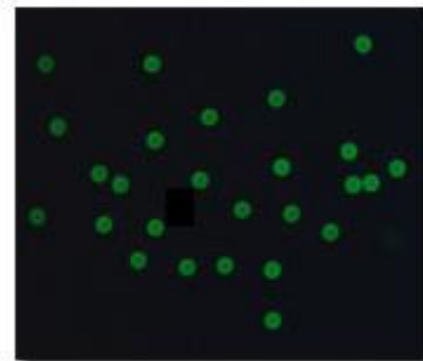


Vliv zaostření na velikost Airyho disku

Částice v rovině ostrosti

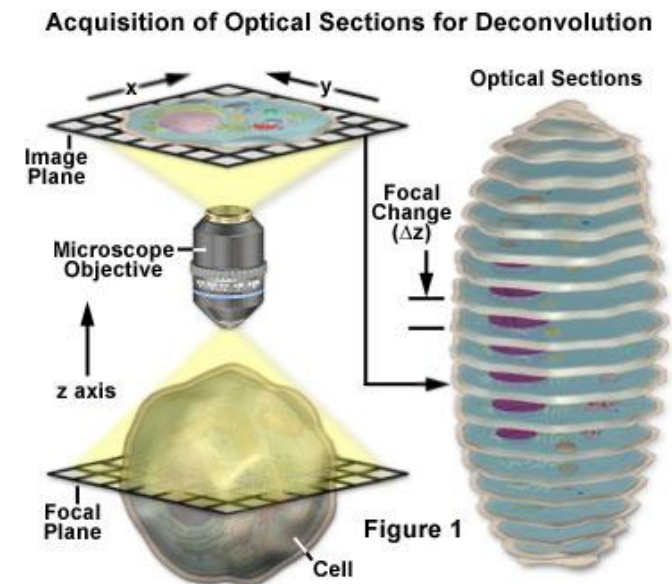
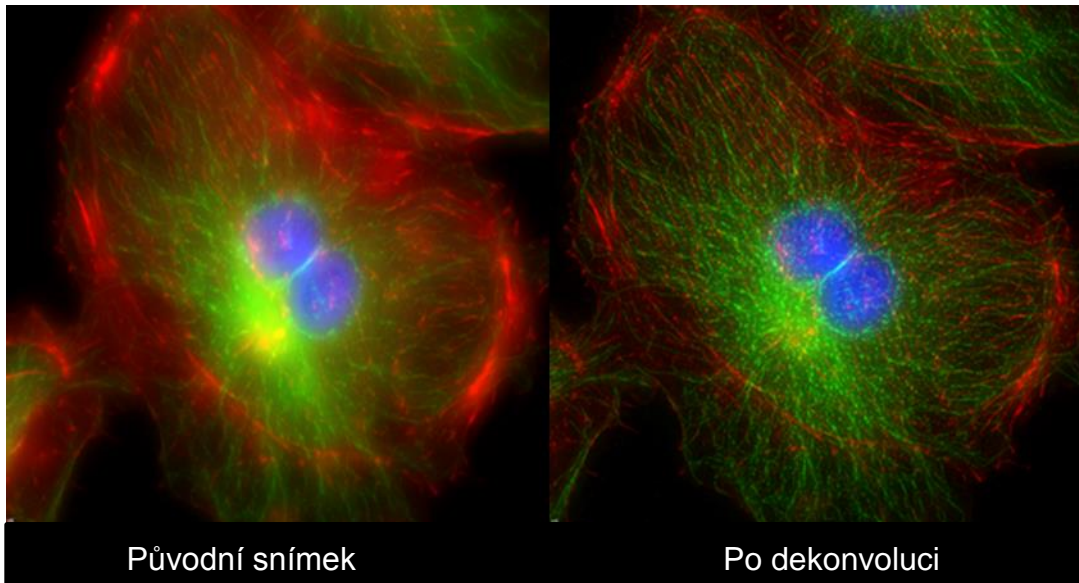


Nezaostřené částice



Dekonvoluce

- **počítačové zpracování obrazu**
- SW na základě znalosti PSF odstraní signál vznikající difrakcí světla
- zvýšení kontrastu a rozlišení - odstranění neostrých částí obrazu
- 2D dekonvoluce - lze využít pro tvorbu 3D obrazu z jednotlivě upravených nasnímaných rovin
- 3D dekonvoluce – každý pixel 3D obrazu (náročná na čas a výkon počítače)
- <https://svi.nl/HuygensDeconvolution>



Superrozlišovací mikroskopie

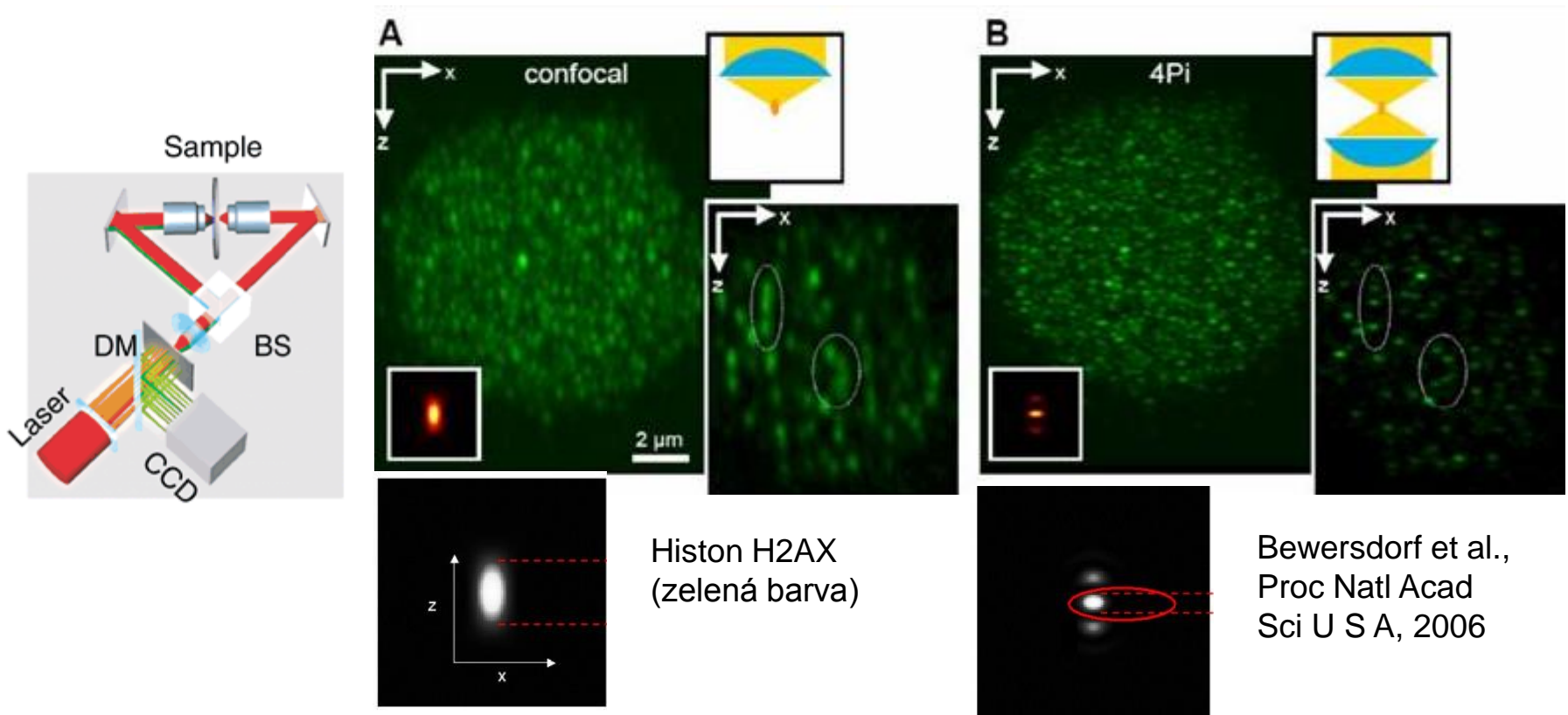
- optická mikroskopie umožňující pozorovat objekty **s rozlišením vyšším než difrakční limit**



2014 – Eric Betzig, Stefan Hell a William Moerner
Nobelova cena za chemii: "for the development of super-resolved fluorescence microscopy"

4pi mikroskopie (1991 – vynalezl Stefan Hell)

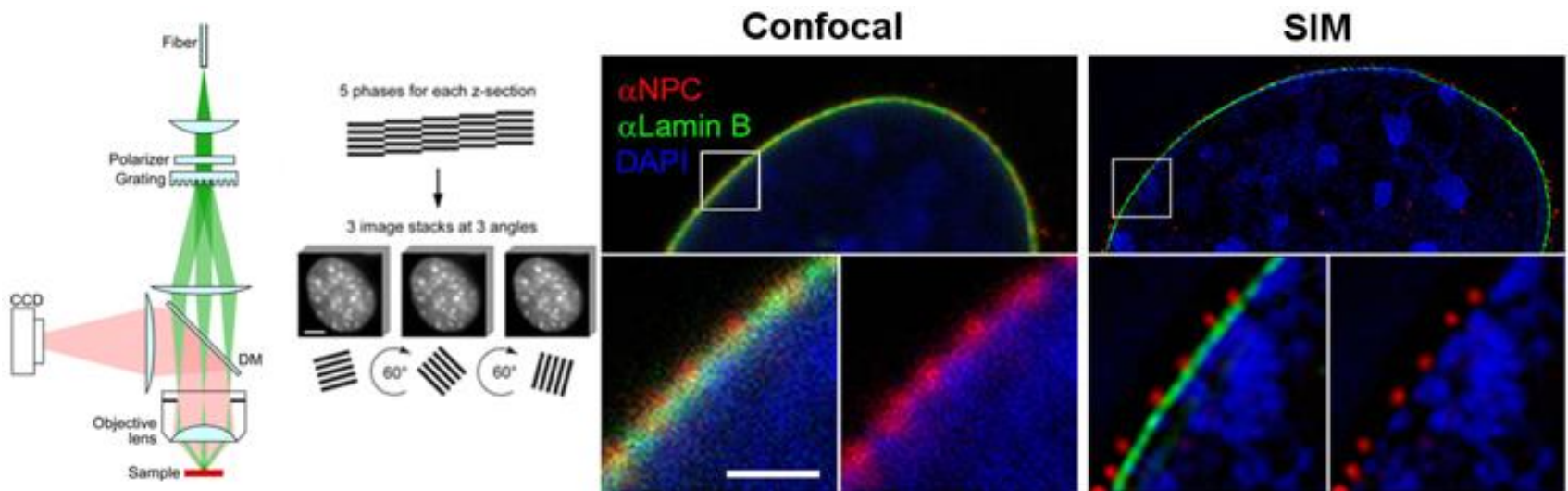
- využívá **druhého objektivu**, který snímá opačnou stranu vzorku
- zaostřeny do stejného bodu → výsledný součet 2 signálů (vlnoploch) přináší až 7x lepší rozlišení v ose Z oproti běžnému konfokálnímu mikroskopu



Mikroskopie se strukturovaným osvětlením (SIM)

Structured Illumination Microscopy

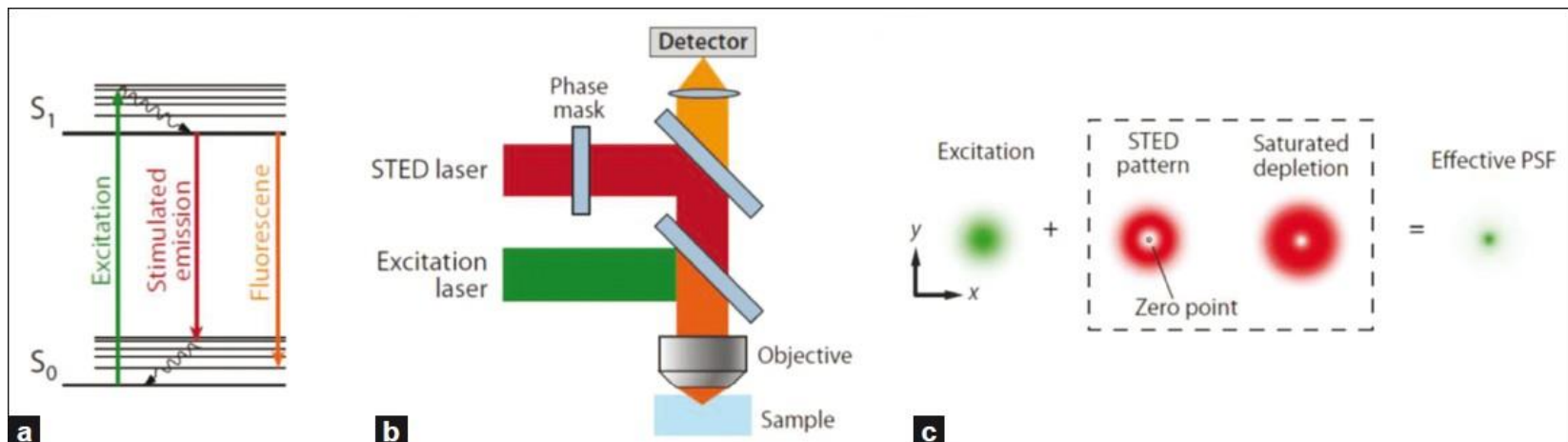
- Levná a jednoduchá metoda pro získání optických řezů
- Využívá standartní wide-field mikroskop
- osvětlení vzorku světlem s pruhovaným vzorem vzniklým difrakcí na mřížce
- 5-7 snímků přes mřížku pro vytvoření obrazu
- Efekt vyvolaný osvětlením přes mřížku se používá k identifikaci fluoroforů, které se nachází v rovině zaostření jednotlivých snímků – složení obrazu



Vyčerpání stimulovalanou emisí (STED)

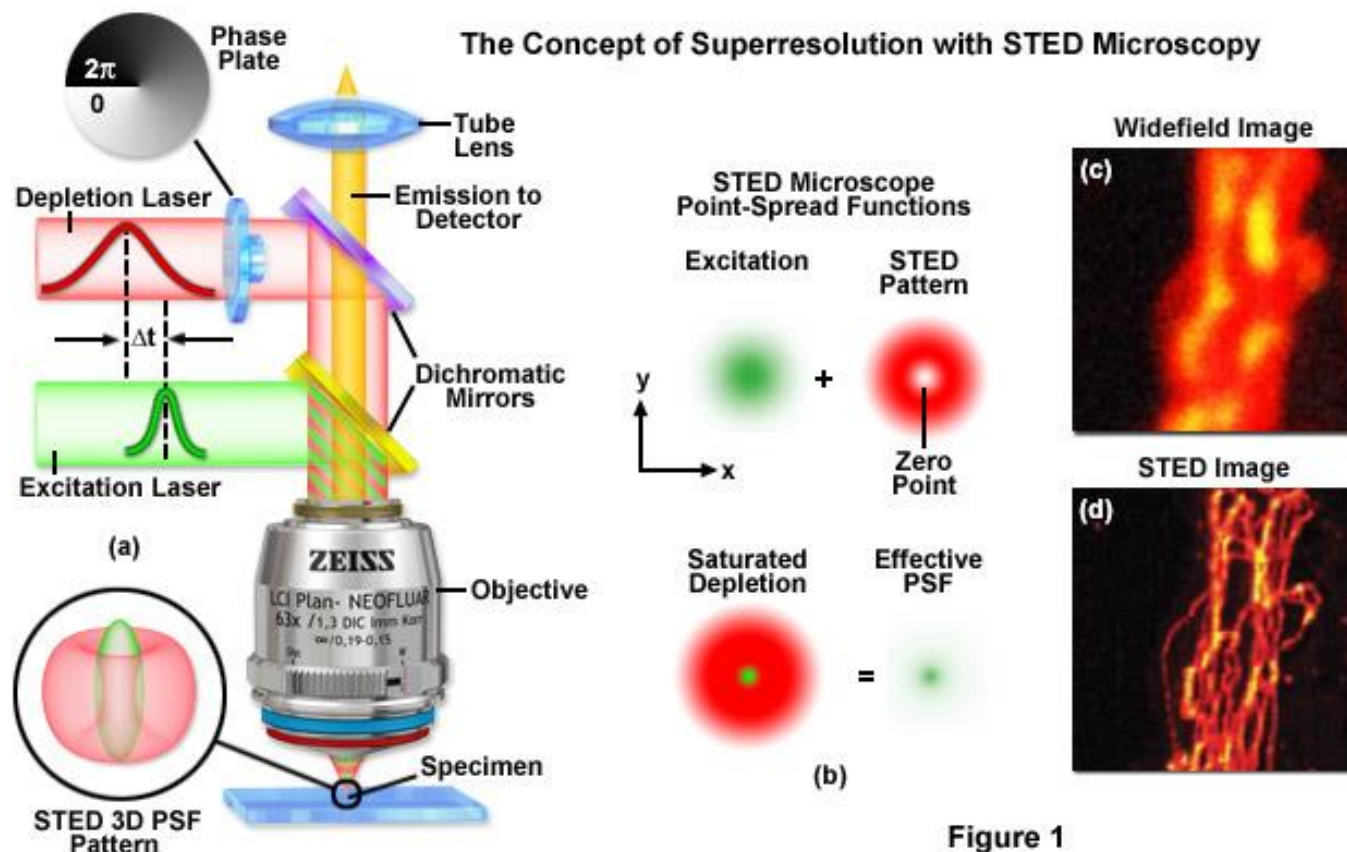
Stimulated Emission Depletion

- 1994 – vynalezl Stefan Hell a Jan Winchmann
- **spolu s excitačním světlem se oblast ozáří i světlem s delší vlnovou délkou** (tvar mezikruží; depletion donut, STED pattern)
- v oblasti STED dochází k vyzáření fluorescence o vlnové délce shodné s depletion beam = odfiltrováno
- **zůstává fluorescenční záření pouze v nezhášené oblasti** uvnitř mezikruží
- Výkonný pulsní laser - drahé

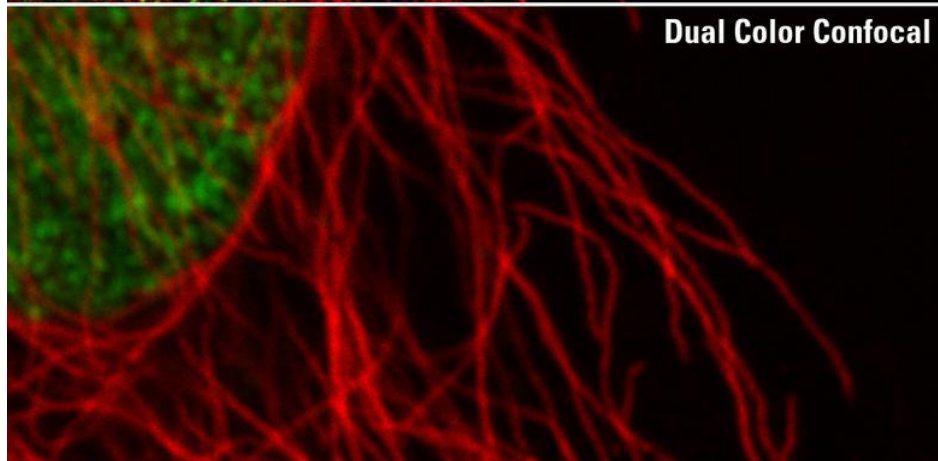
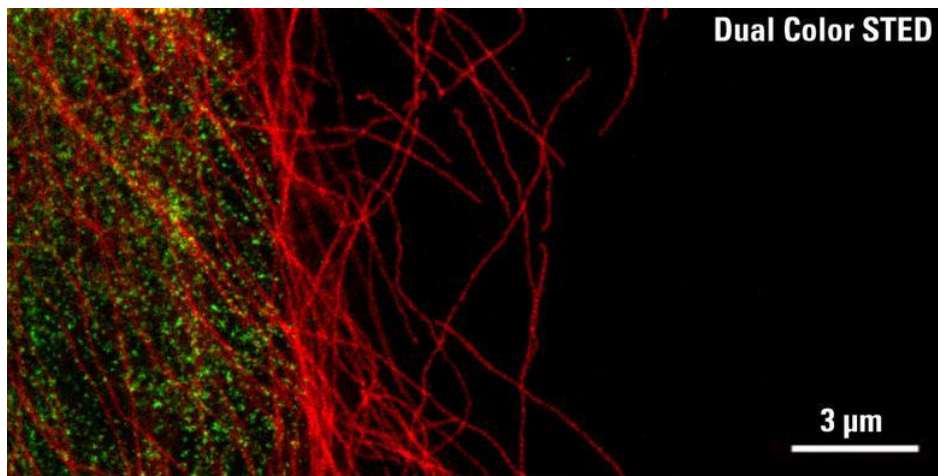


STED

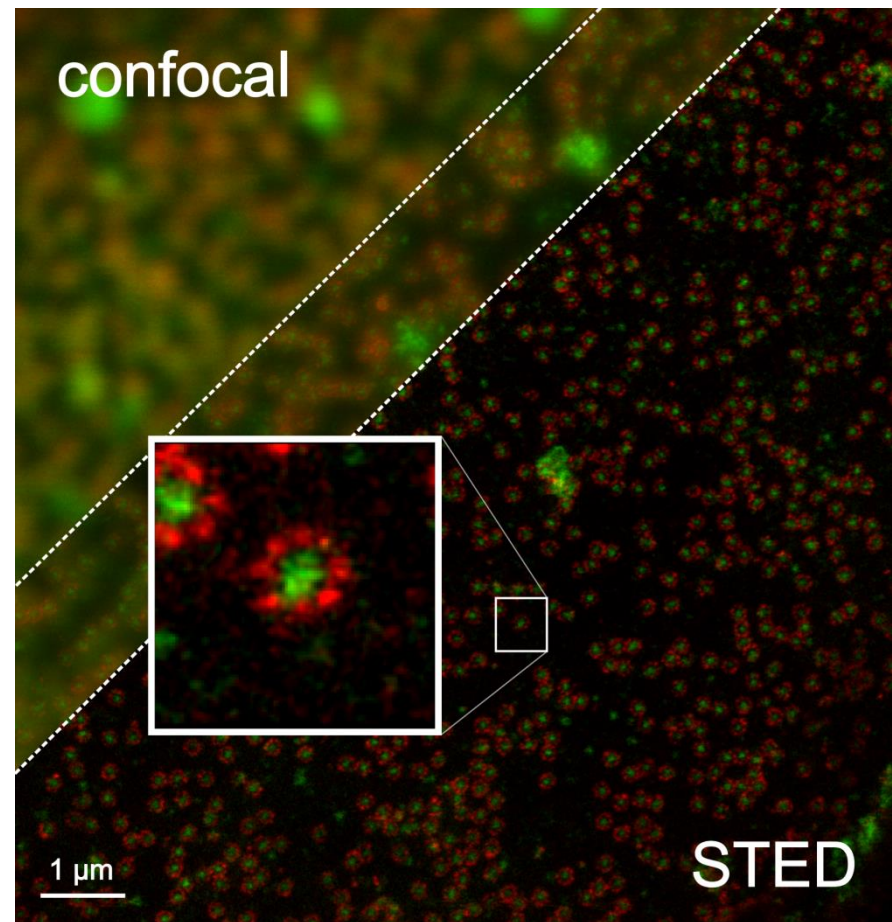
- laterální rozlišení (osy X-Y) obecně asi 20 nm, axiální (osa Z) 40-50 nm



STED



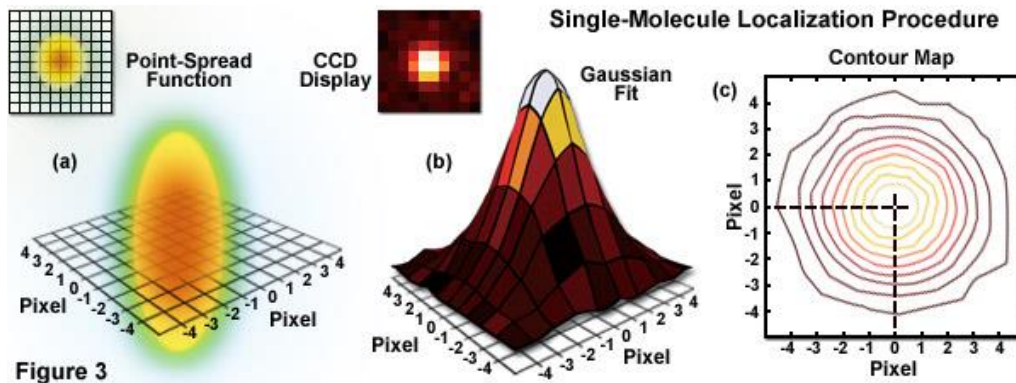
Histon H3 (zelená); mikrotubuly (červená)



Proteinové komplexy jaderného póru

Single-Molecule Superresolution Imaging

- **STORM** – stochastic optical reconstruction microscopy
- **PALM** – photoactivated localization microscopy (vynalezl Eric Betzig)
- **FPALM** – fluorescence photoactivation localization microscopy
- využívají wide-field mikroskopii
- vychází z **fluorescence jednotlivých (nepřekrývajících se) molekul fluorochromů** (single-molecule imaging)

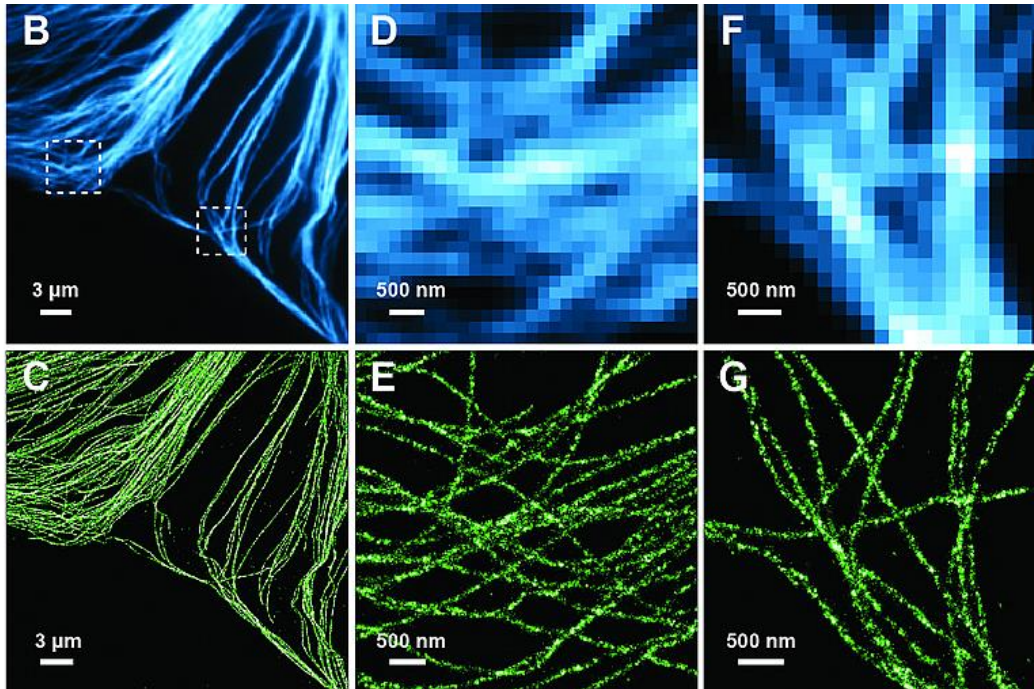
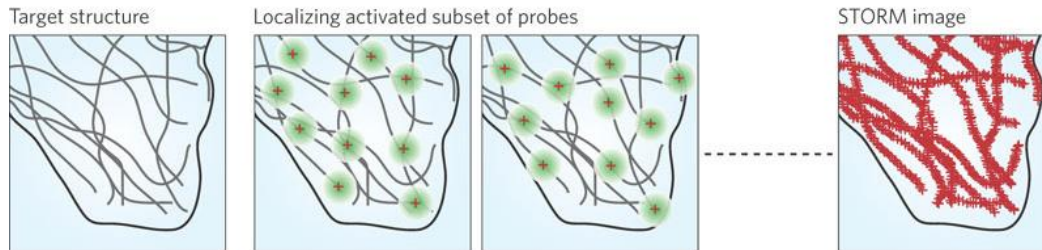


Velké množství fluorochromů (cílových molekul) a příliš blízko



→ nelze rozlišit jednotlivé molekuly

Single-Molecule Superresolution Imaging



1. Snímek fluorescence jednotlivých molekul (nepřekrývajících se) fluochromů = **snímek obsahuje pouze omezený počet signálů**
2. **Softwarově určen střed (pozice) daných molekul**
3. Další snímek zaznamená jiné nepřekrývající se fluorochromy
4. Softwarově určen střed (pozice) těchto molekul
5. **Výsledný obraz je tvořen složením (překryvem) tisíců takových snímků**

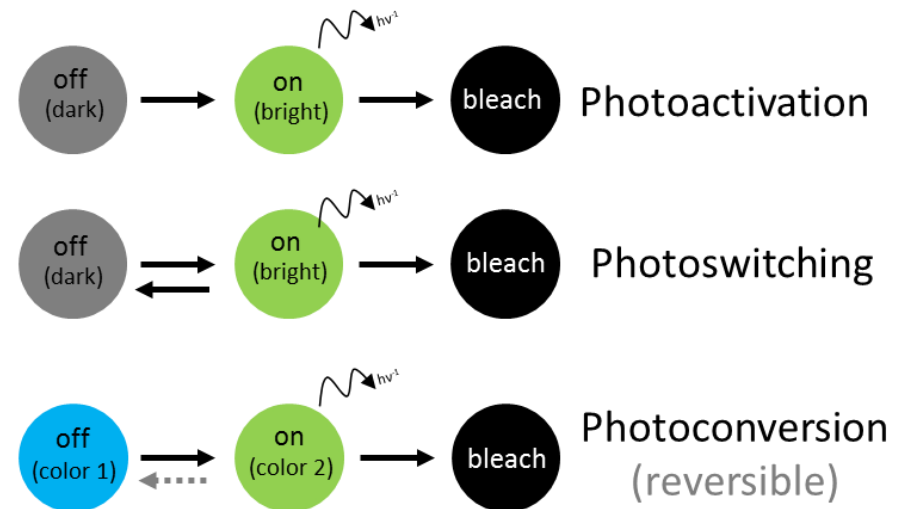
Single-Molecule Superresolution Imaging

- William Moerner: „**photoswitchable**“ značka - eYFP lze reaktivovat modrým světlem (405 nm) → lze znovu excitovat světlem 488 nm

- značky** (fluorescenční proteiny, fluorochromy) **musí umožňovat změnu spektrálních vlastností** za pomoci světla o definované délce

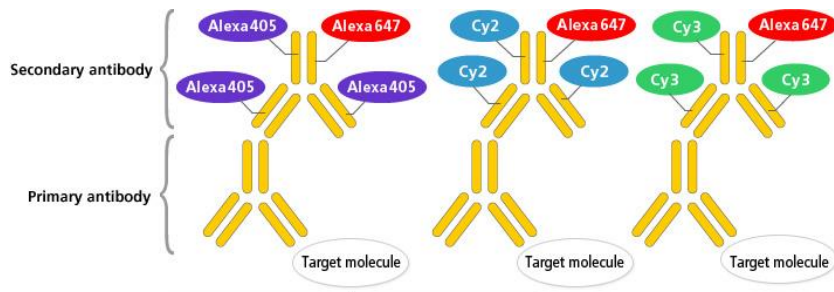
(Chozinski et al., FEBS Lett, 2014)

- fotoaktivace (photoactivation)
- „fotopřepínání“ (photoswitching)
- fotokonverze (photoconversion)
- použití laseru s nízkou intenzitou**
- jednotlivé molekuly fluorochromů – nízká pravděpodobnost zásahu a změny stavu (off→on)



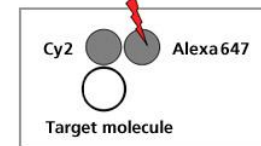
Single-Molecule Superresolution Imaging

System dvojice fluorochromů: aktivátor + „photoswitchable“ reportér

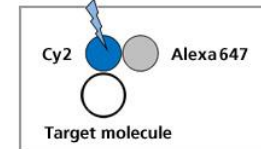


Dye for activation	Dye for image capturing
Alexa405	Alexa647
Cy2	Alexa647
Cy3	Alexa647

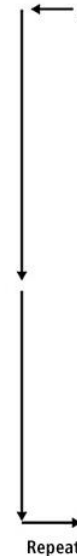
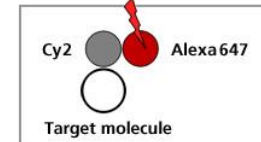
STEP 1 Inactivates all molecules



STEP 2 Alexa647 is randomly activated by irradiating Cy2 with low-intensity



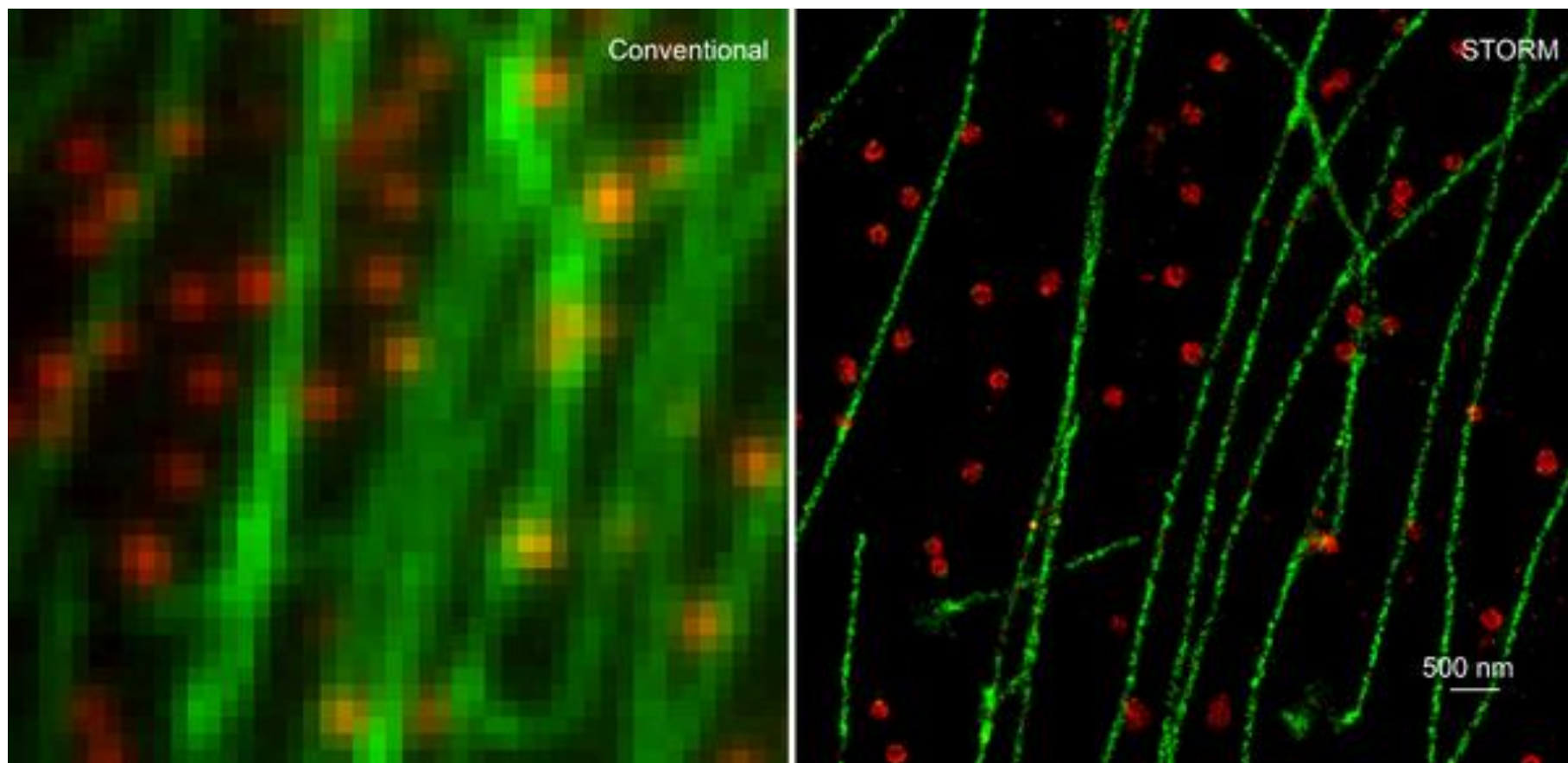
STEP 3 Excite Alexa647 with strong light and capture images of localization information



<http://www.microscopyu.com/tutorials/flash/superresolution/storm/index.html>

STORM

- laterální rozlišení <10 nm, axiální rozlišení <20 nm

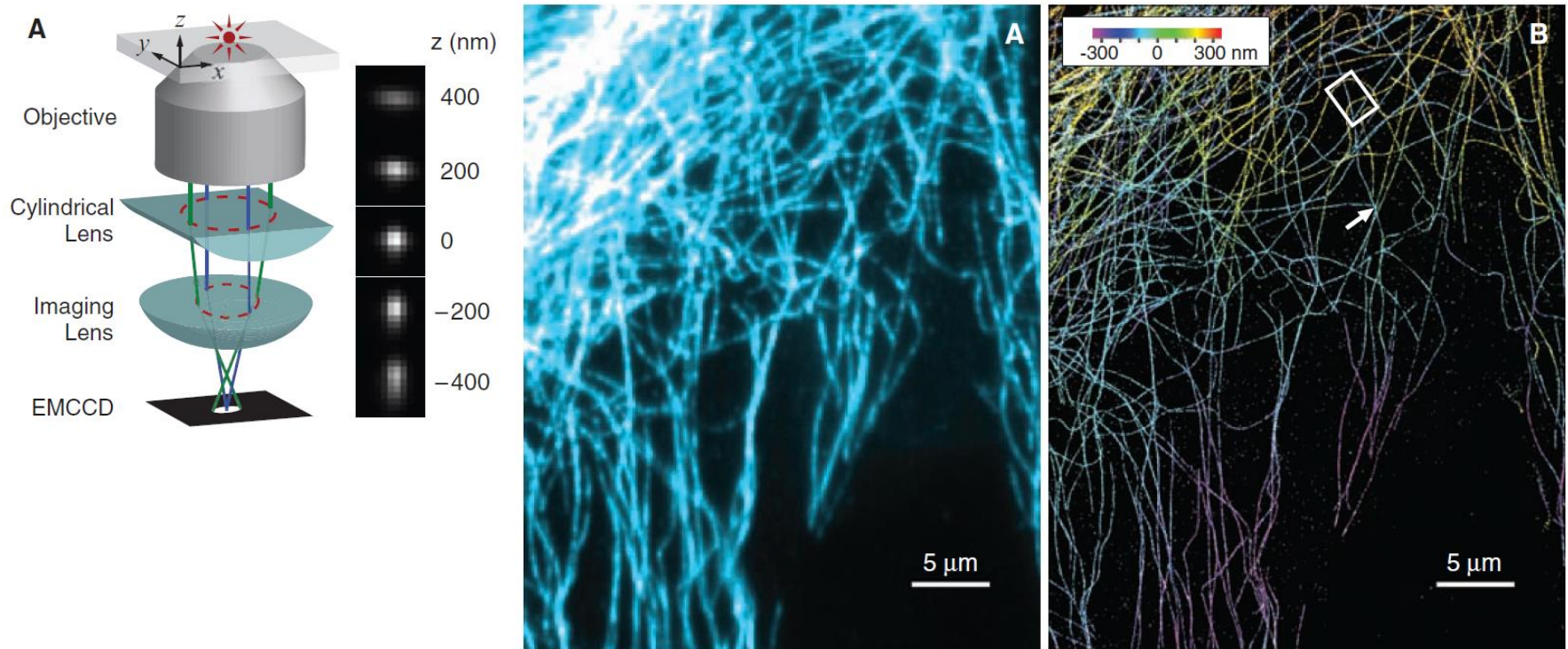


Mikrotubuly (zelená), klatrinem potažené jamky (červená; clathrin-coated pits)

3D-STORM

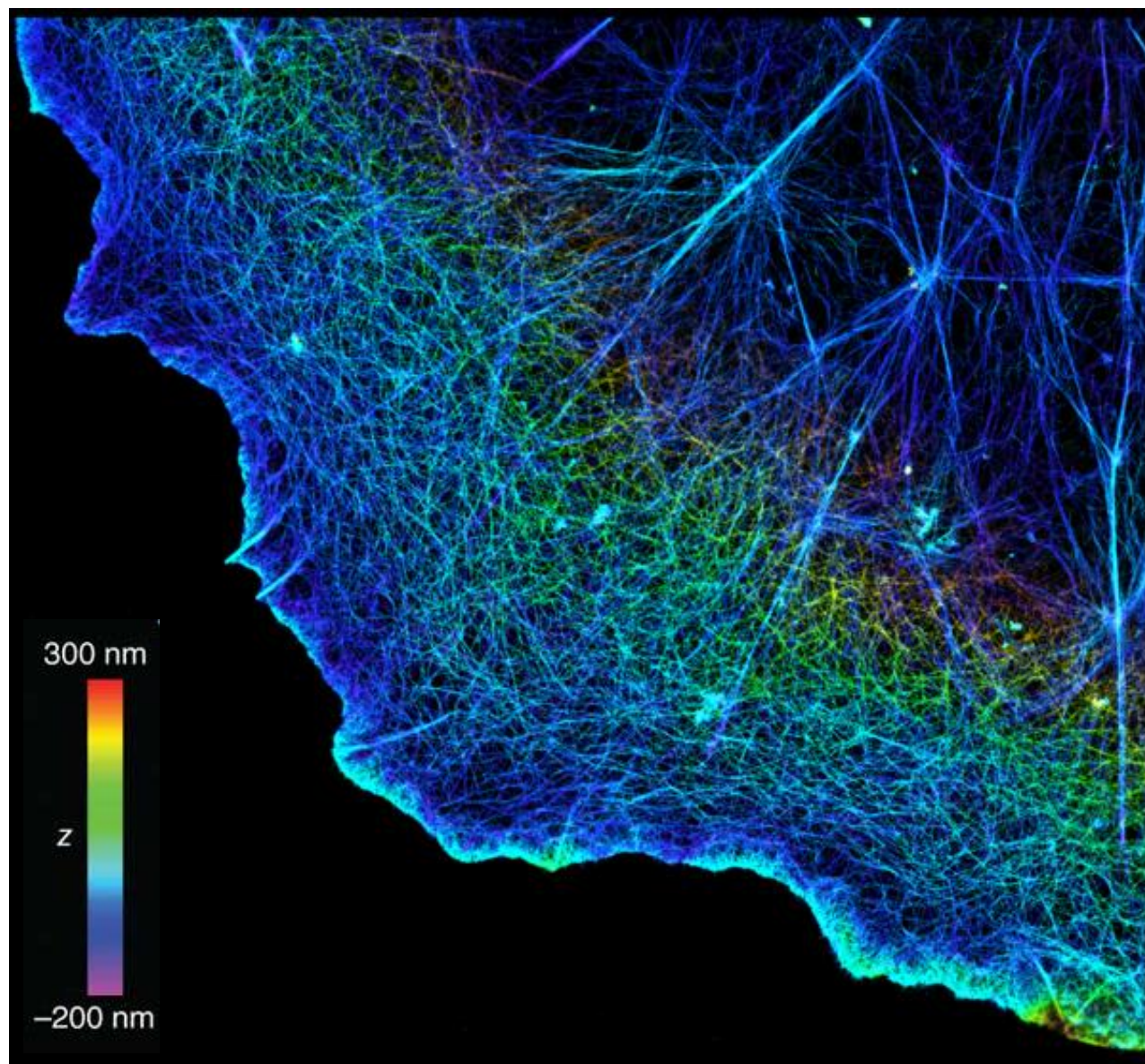
(Huang et al., Science, 2008)

- modifikace: do objektivu přidána **cylindrická čočka** – cílená změna PSF
- lze určit pozici v rovině Z a zobrazit v rámci snímku



Mikrotubuly – pozice v Z rovině odpovídá barvě

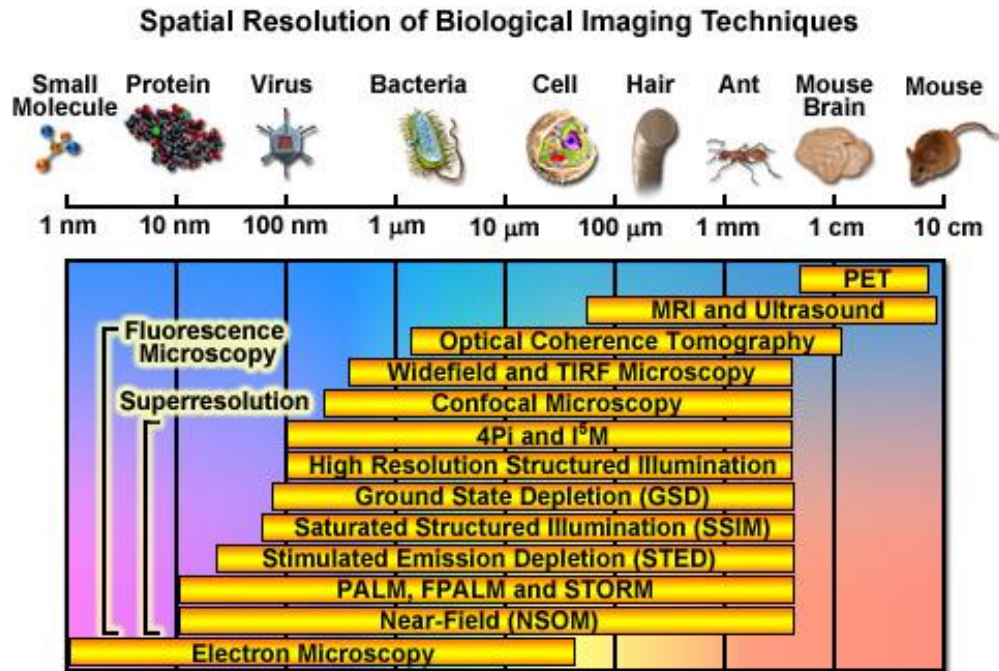
3D-STORM



Aktin – pozice v Z rovině
odpovídá barvě

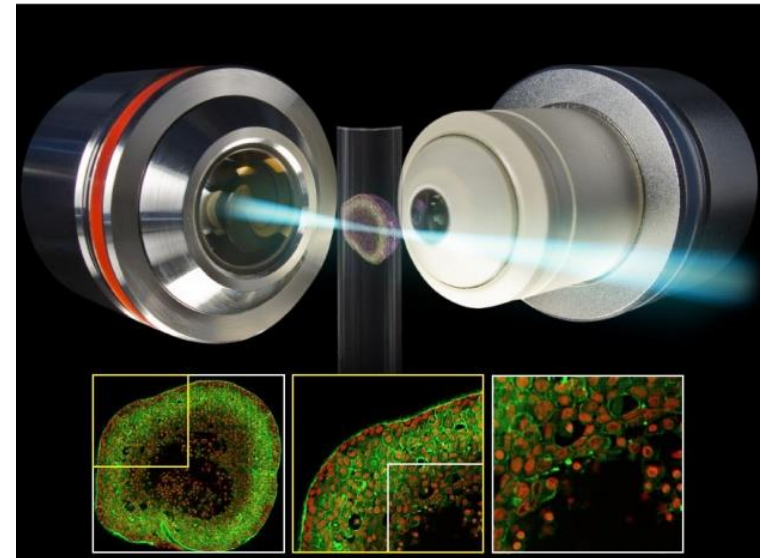
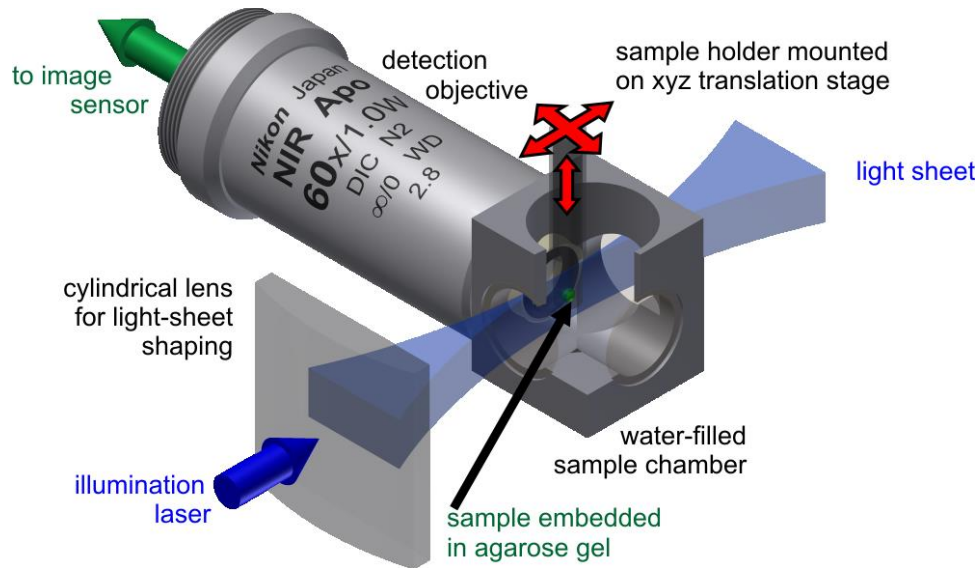
Porovnání rozlišení zobrazovacích technik

	x / y	z
• Wide-field fluorescenční MS:	230	1000 nm
• Konfokální a multiphoton MS :	180	500
• Superrezoluční MS: 4Pi	200	90
SIM:	100	250
STED, PALM, STORM:	20	50



Light Sheet Fluorescence Microscopy (LSFM)

- zdroj světla je umístěn kolmo k optické dráze
- osvětlení vzorku pomocí úzké roviny světla (light sheet)
- nedochází k excitaci fluoroforů mimo rovinu světla = vhodné pro optické řezy

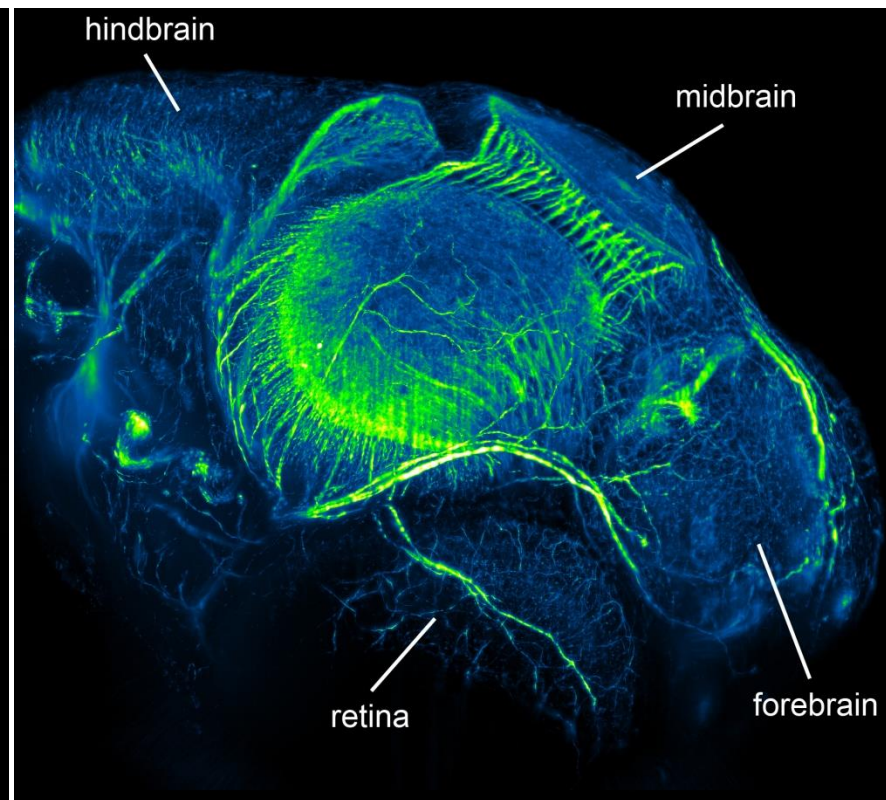


- vzorek uzavřen v agaróze, hydrogelu ve skleněné kapiláře (nedochází k deformacím objektu); posun objektu a otáčení → skládání 3D obrazu
- **výhodná zobrazovací metoda pro 3D zobrazování velkých objektů**

Light Sheet Fluorescence Microscopy (LSFM)



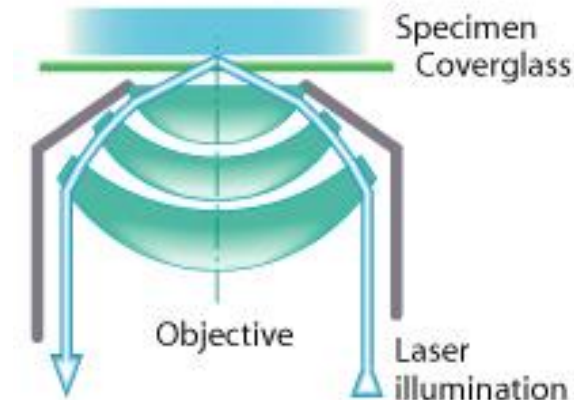
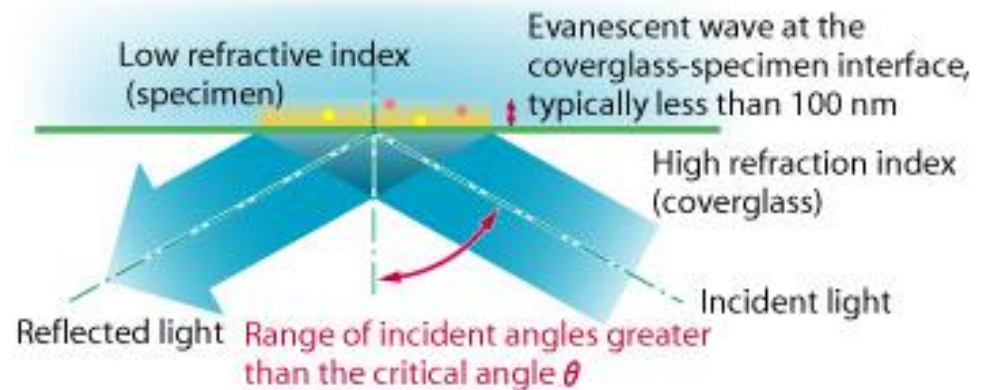
Medaka japonská – acetylovaný tubulin (zelená)



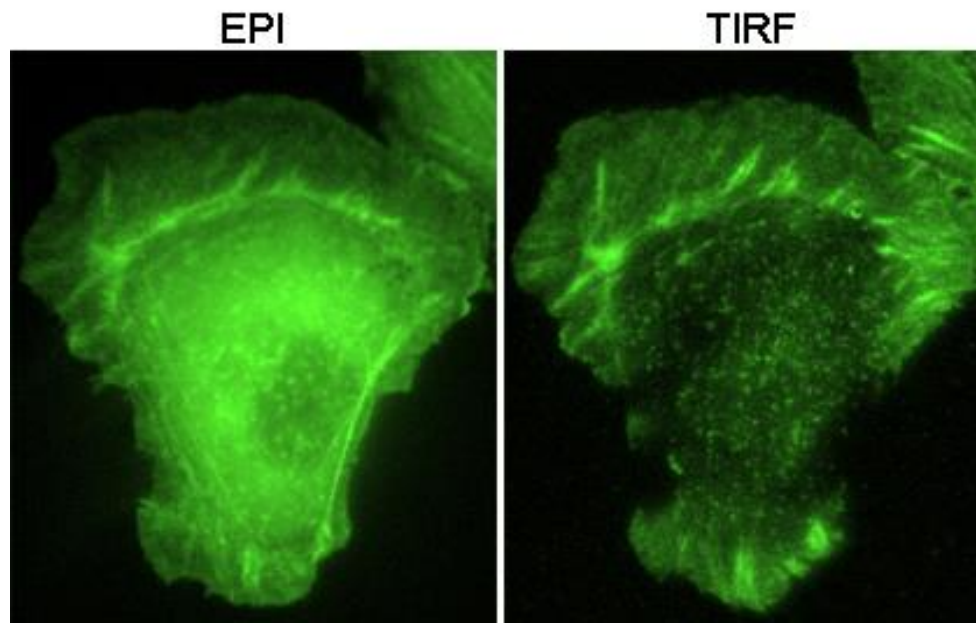
Hlava medaky – 20x zvětšeno

Total internal reflection fluorescence (TIRF)

- velmi vhodná metoda pro studium dějů na membráně
- výborné axiální rozlišení
- „evanescent wave“ proniká v preparátu pouze do hloubky cca 100nm



Total internal reflection fluorescence (TIRF)



F-aktin (zelená) v nádorové buněčné linii