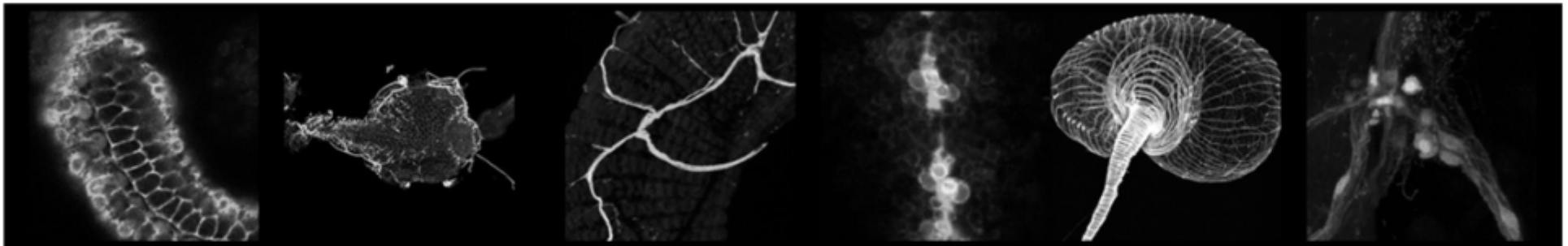
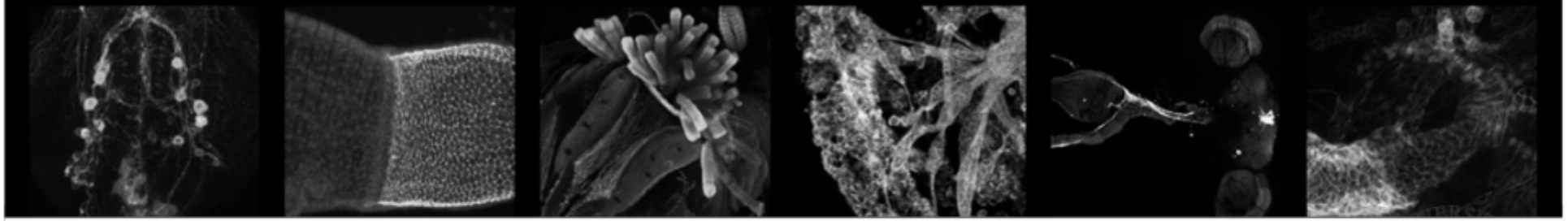


Konfokální mikroskopie a nové trendy ve fluorescenční mikroskopii

RNDr. Jan Škoda, Ph.D. (přednáší Mgr. Blanka Jančeková, Ph.D.)
Ústav experimentální biologie PřF MU



EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Program přednášky

- Historie a princip konfokální mikroskopie
- Typy konfokálních mikroskopů
- Multifotonová mikroskopie
- Možnosti zobrazení
- Rozlišení a dekonvoluce
- Superrozlišovací mikroskopie
- Speciální metody ve flouorescenční mikroskopii

Historie konfokální mikroskopie

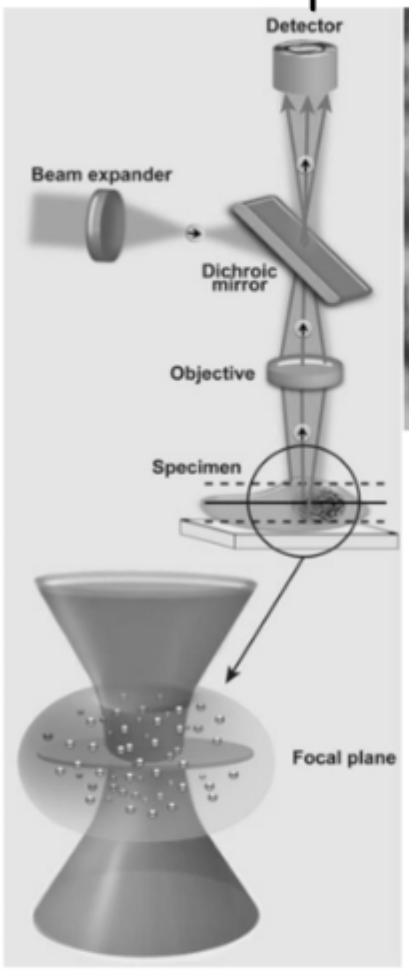
Marvin Lee Minsky

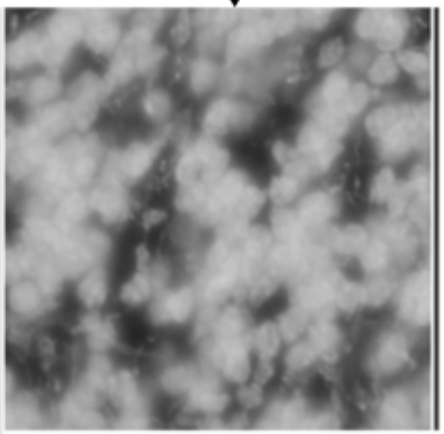
(9. srpna 1927 – 24. ledna 2016)

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

ALE JAK?

Standardní (widefield) fluorescenční mikroskop

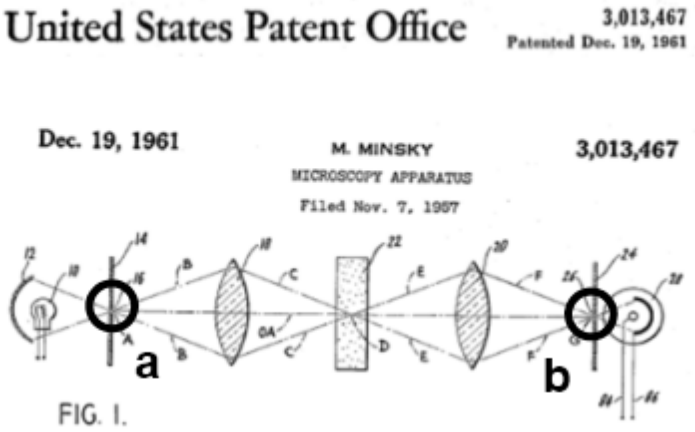




Neostrý obraz tkáně mozku z důvodu zachycení fluorescence struktur mimo rovinu ostrosti

Historie konfokální mikroskopie

- Marvin Minsky sestrojil **první konfokální mikroskop** (1957 podal patent)
- navrhl konstrukci pro procházející i odražené světlo


United States Patent Office 3,013,467 Patented Dec. 19, 1961

Dec. 19, 1961 M. MINSKY 3,013,467

MICROSCOPY APPARATUS

Filed Nov. 7, 1957

a b

FIG. 1.

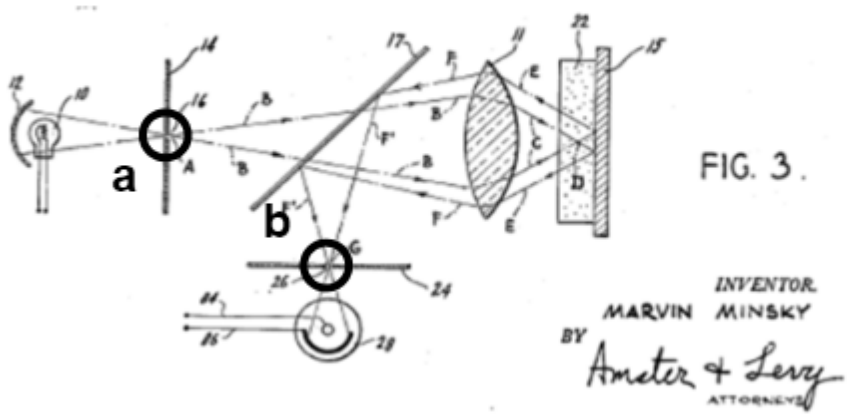

a b

FIG. 3.

INVENTOR. MARVIN MINSKY

BY Amster & Levy

ATTORNEYS

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

Princip konfokálního mikroskopu

- Konstrukce konfokálního mikroskopu umožňuje odfiltrovat fluorescenční signál z oblastí preparátu mimo rovinu ostrosti a detekovat fluorescenční signál pouze z úzké roviny ostrosti preparátu = umožňuje zobrazit optické řezy

- základem jsou **2 konfokální bodové clonky v dráze světla** (pinhole apertures)
  - a) před zdrojem světla → úzký paprsek světla do konkrétního bodu
  - b) před detektorem → propustí pouze světlo zaostřené na úzkou rovinu

- konfokální = konjugovaný + fokální (tj. sdružený s ohniskem); do stejného bodu je zaostřen paprsek osvětlující i paprsek zprostředkující pozorování = obě bodové clonky jsou v tzv. konjugovaných rovinách ostrosti (současně zaostřené)

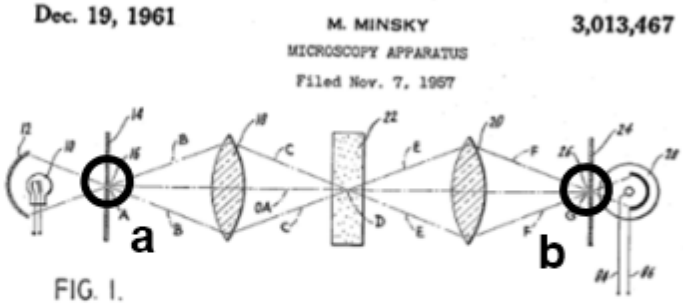


FIG. I.

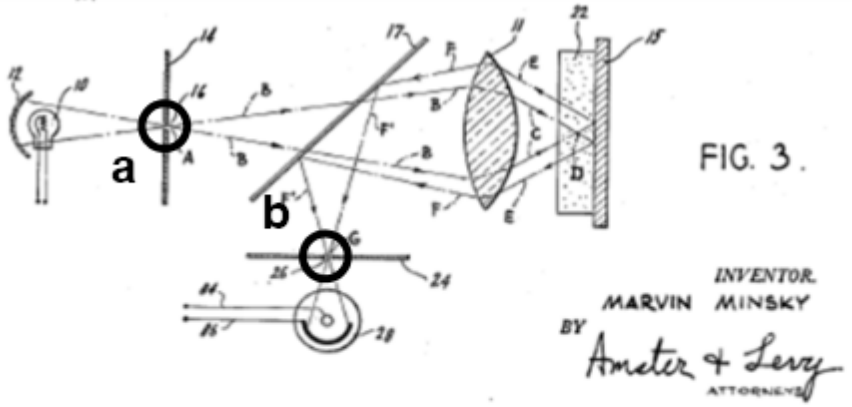
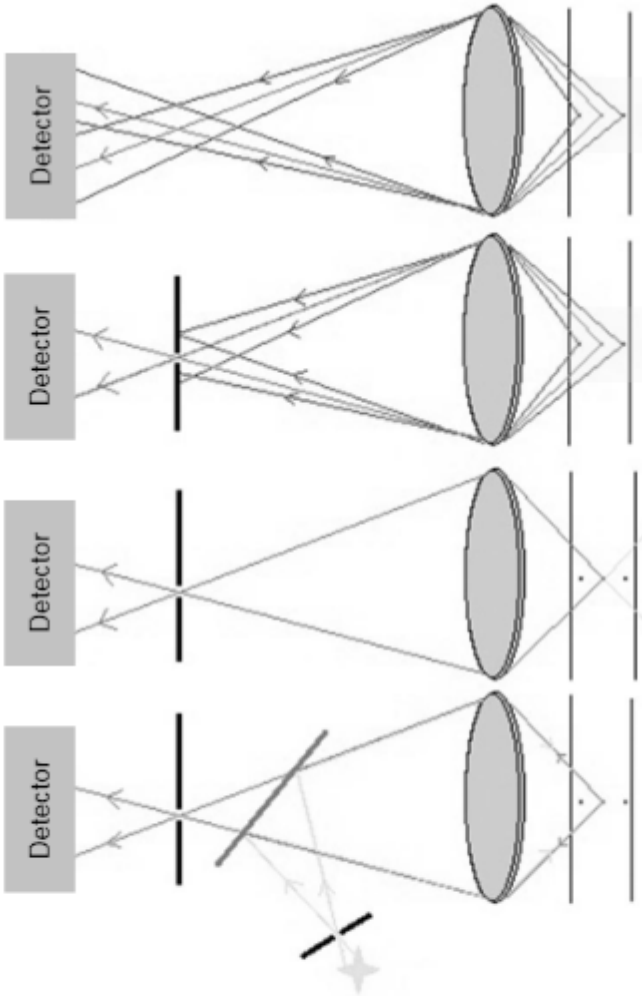


FIG. 3.

Princip konfokálního mikroskopu

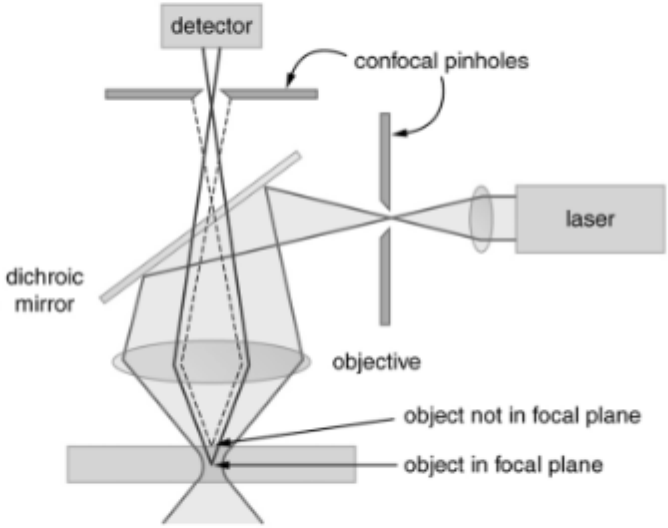


Světlo excituje širokou oblast vzorku a do detektoru se dostává i fluorescence mimo rovinu ostrosti

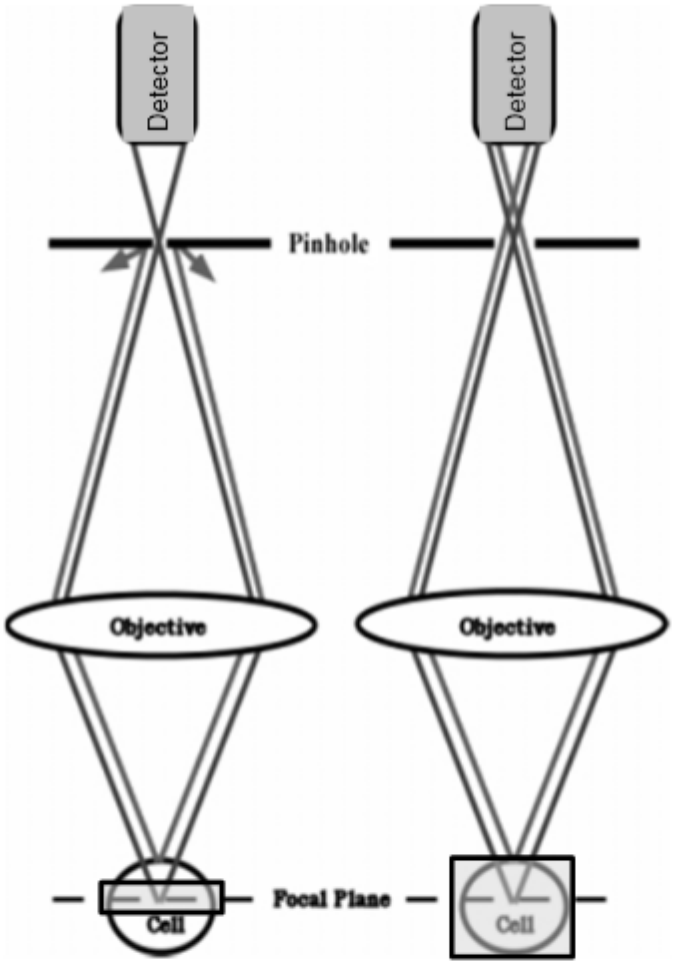
Bodová clona před detektorem blokuje průniku signálů mimo rovinu ostrosti

Konfokální bodová clona zaostřuje světlo do shodné roviny ostrosti v pozorované oblasti – redukce nežádoucí fluorescence mimo zaostření

Dichroické zrcátko umožňuje, aby zdroj světla byl v rámci mikroskopu umístěn ve stejné rovině jako detektor



Princip konfokálního mikroskopu - tloušťka optického řezu



Rozlišení v ose Z = tloušťka optického řezu závisí na:

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

Princip konfokálního mikroskopu - tvorba výsledného obrazu

- bodová clonka umístěná před zdroj světla určuje velikost bodu, který bude v jednom momentu osvětlen
- uspořádání mikroskopu tak umožňuje v jednom kroku získat informaci pouze o jednom bodu (velmi omezené oblasti)
- pro sestavení obrazu celé roviny je nutné postupně nasnímat signál z dostatečného množství bodů dané roviny.

3 možnosti snímání vzorku

a) pohybuje se vzorek (Minsky)

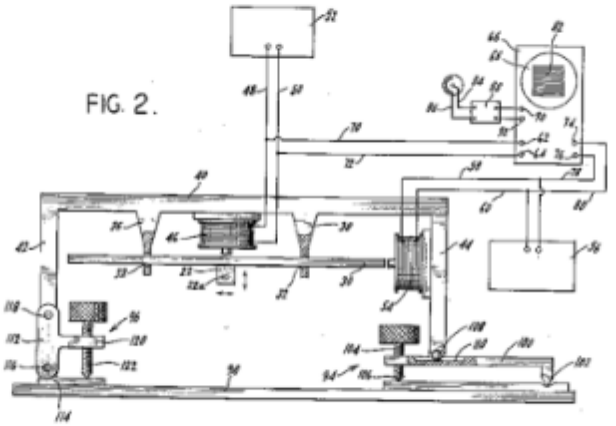
b) pohybuje se objektiv (David Egger a Paul Davidovits; doi:10.1038/223831a0)

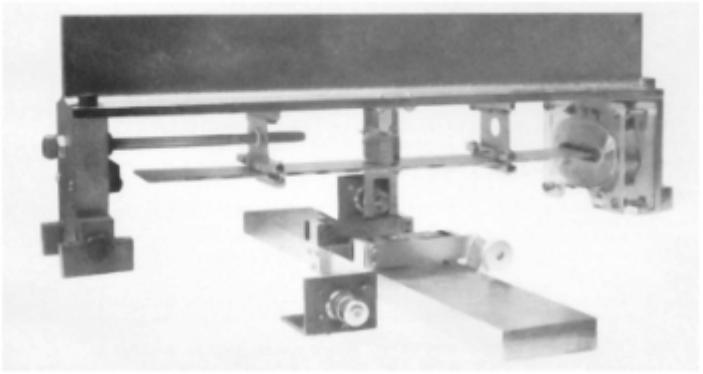
c) **pohybuje se paprsek světla** – (skenování, rastrování)

- multiple-beam scanning – konfokální mikrokop na bázi Nipkowova disku
- single-beam scanning – laserový skenovací konfokální mikroskop

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

× ve své době tento pokrok zůstal bez odezvy, neboť Minsky nenašel vhodný (dostatečně výkonný) zdroj světla pro konstrukci funkčního

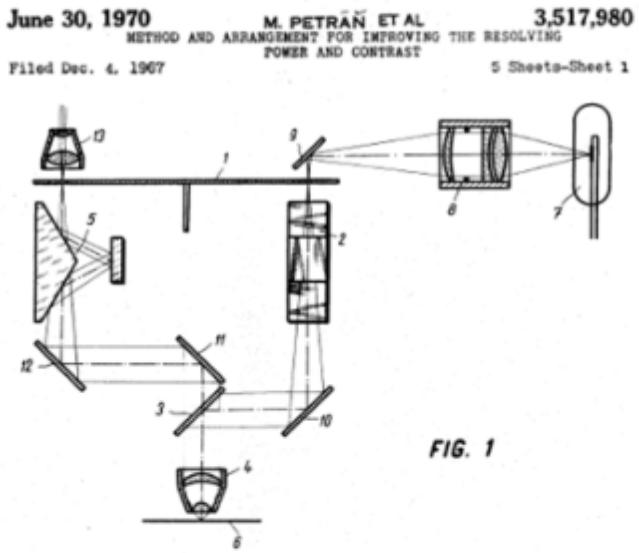
× celkový obraz (složení jednotlivých bodů) vytvářen pomocí pohybu stolku s preparátem

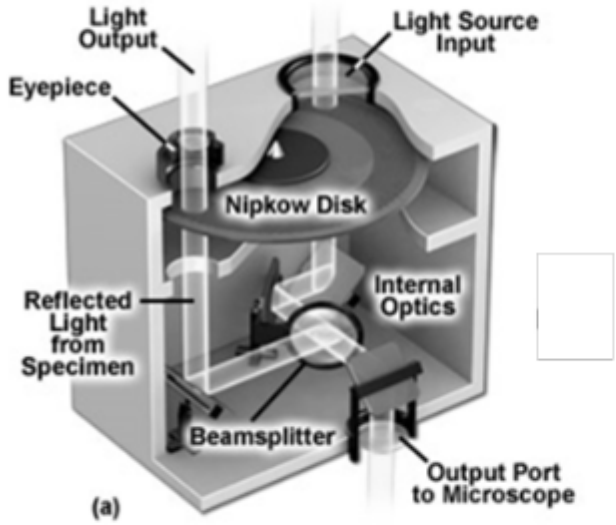
× počítače nebyly dostatečně výkonné a dostupné – obraz byl promítán skrze armádní radar (bez záznamu; snímek zobrazen 10s, pak nový sken)

Konfokální mikroskop na bázi rotujícího Nipkowova disku

prof. Mojmír Petráň (28. března 1923) shlédnout dokument ČT

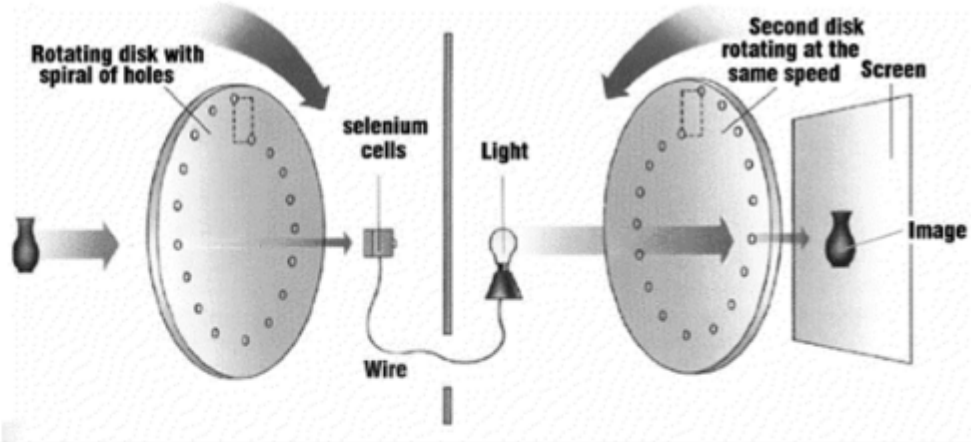
- profesor biofyziky; působil na Lékařské fakultě UK v Plzni
- modifikace Nipkowova disku pro optickou mikroskopii a zároveň zajišťující konfokální efekt → Tandem Scanning Confocal Microscope
- v roce 1967 patentoval v USA se spolupracovníkem Milanem Hadravským
- 1968 – výroba v rámci JZD Komorno u Plzně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


June 30, 1970 M. PETRÁŇ ET AL 3,517,980
METHOD AND ARRANGEMENT FOR IMPROVING THE RESOLVING POWER AND CONTRAST
Filed Dec. 4, 1967 5 Sheets-Sheet 1
FIG. 1



Nipkowův disk

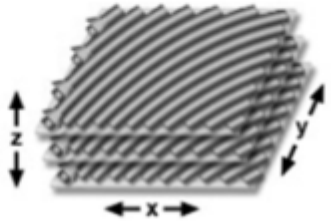
- **Paul Nipkow** (1860–1940) - německý inženýr polského původu
- mechanické zařízení, které umožnilo přenos obrazu na dálku, (rychle rotující perforovaná destička, na které je mnoho vzájemně oddělených clonek (pinhole) a přes kterou je světlo zaměřováno na studovaný objekt)
- obsah obrazu převádí řádkováním na jeden světelný a elektrický průběh
- snímání a rozklad obrazu pomocí rotujícího disku po obvodu opatřeného otvory umístěnými ve spirále, vyžaduje 1 snímací fotočlánek, 1884 patentoval
- 1925 byl Nipkowův disk použit pro první (mechanickou) třicetiřádkovou televizi (5 snímků/s)



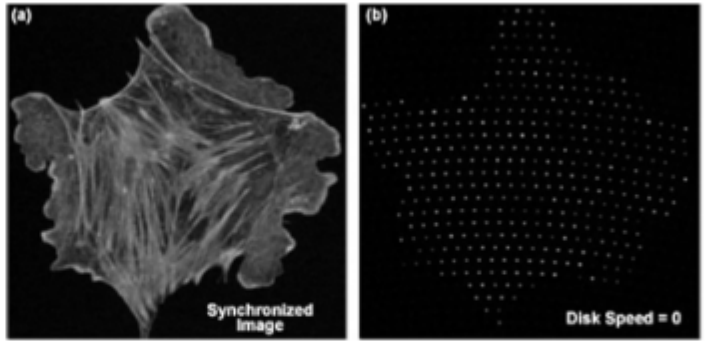
Konfokální mikroskop na bázi rotujícího Nipkowova disku

Spinning Disk Confocal Microscopy (SDCM)

- 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



Spinning Disk Scan Pattern



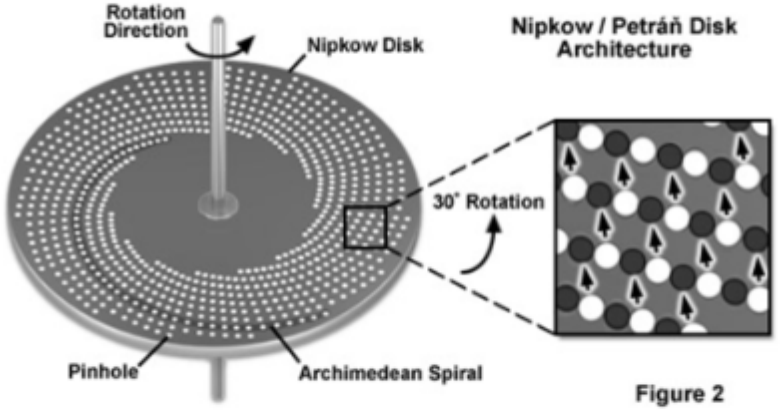


Figure 2

Yokogawa Spinning Disk Unit Optical Configuration

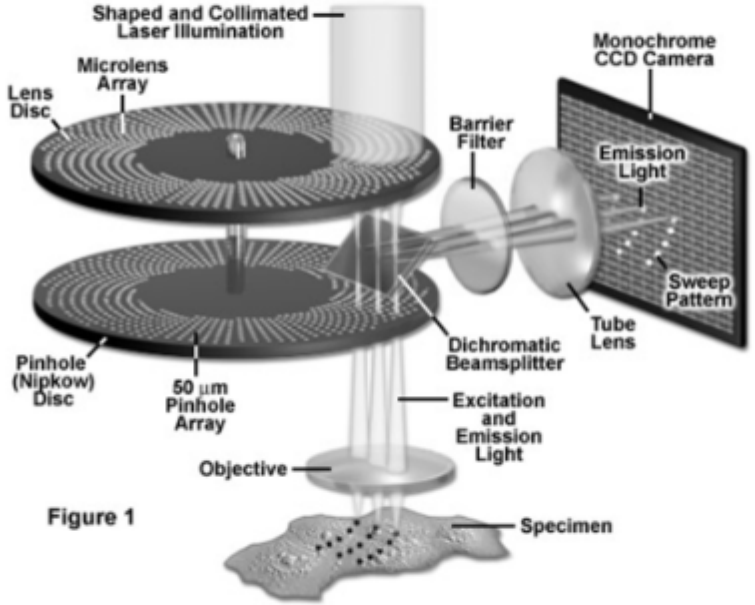


Figure 1

Laserový skenovací (rastrovací) konfokální mikroskop

Laser Scanning Confocal Microscope (LSCM)

- 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

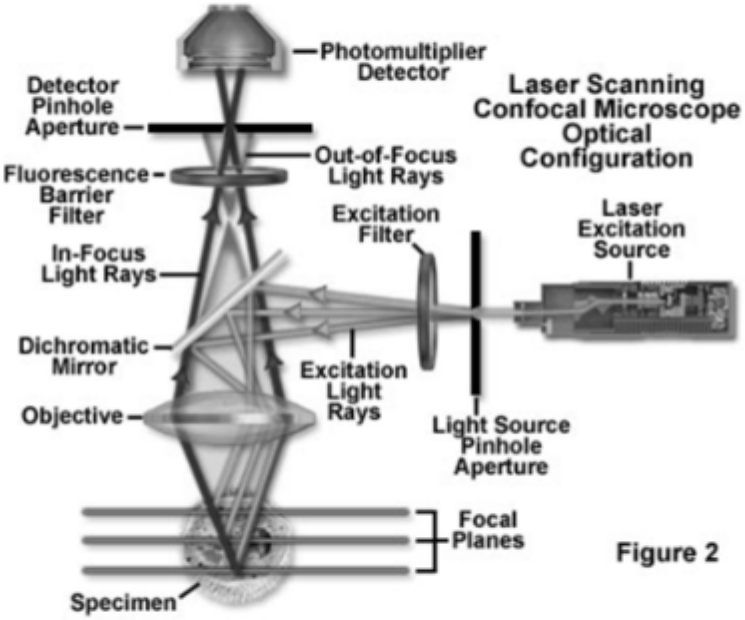
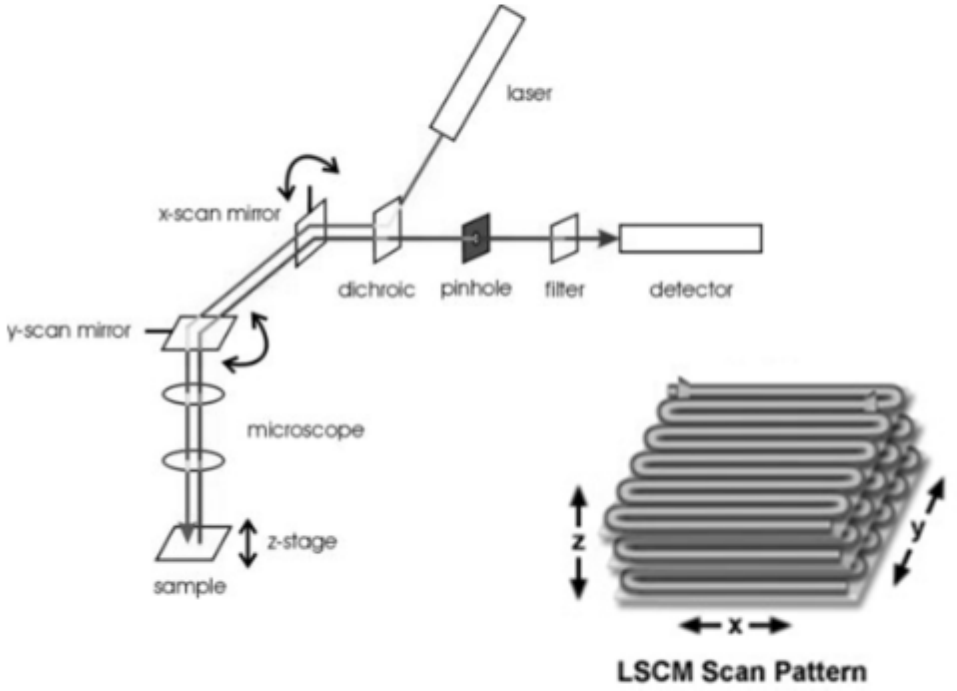


Figure 2

Laser Scanning Confocal Microscope Optical Configuration



LSCM Scan Pattern

Detekce signálu u LSCM

Laserový skenovací konfokální mikroskop snímá vždy intenzitu signálu jen z jednoho bodu v daném čase, nikoli z plochy.

Fotonásobič (photo-multiplier tube, PMT)

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

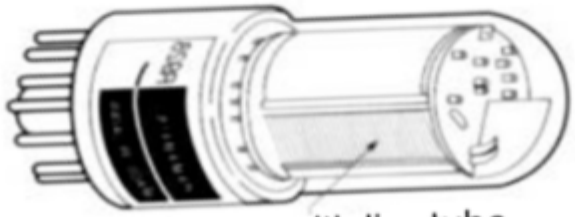


Photo-multiplier tube

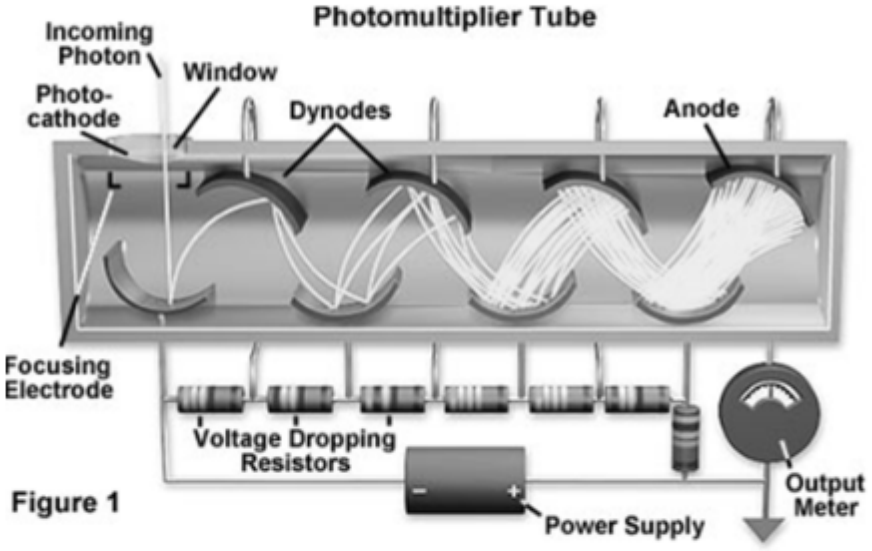


Figure 1

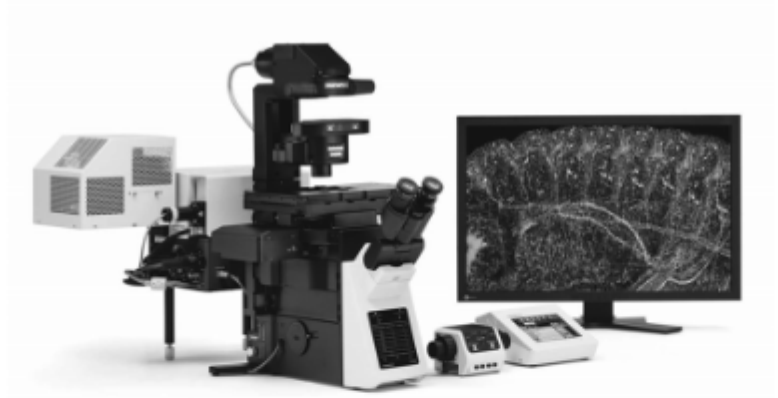
Princip fotonásobiče

- konverze fotonu na elektron (fotokatoda)
- znásobení elektronů (dynody)
- detekce signálu – proudu (anoda)
- signál z fotonásobiče je registrován počítačem spolu s informací o x-y souřadnicích analyzovaných bodů

Moderní konfokální mikroskopie

- **zdroj světla – laser**
- detektor: CCD kamera (SDCM), fotonásobič (LSCM)
- **obraz tvořen v PC**
  - zaznamená intenzitu signálu a polohu bodu
  - v rastru naskenována jedna rovina praparátu, 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+

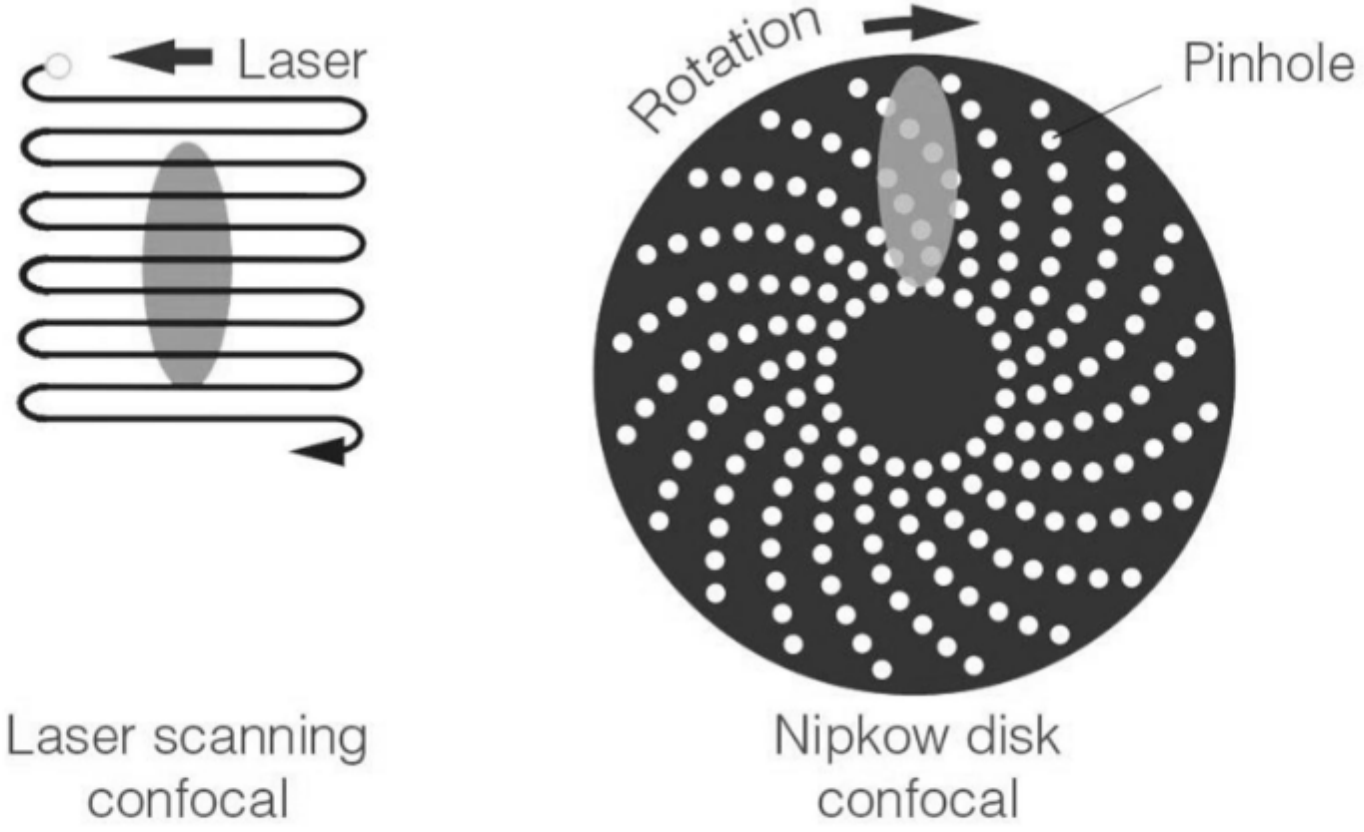


Konfokální mikroskop Olympus FluoView FV1200

Srovnání LSCM a SDCM

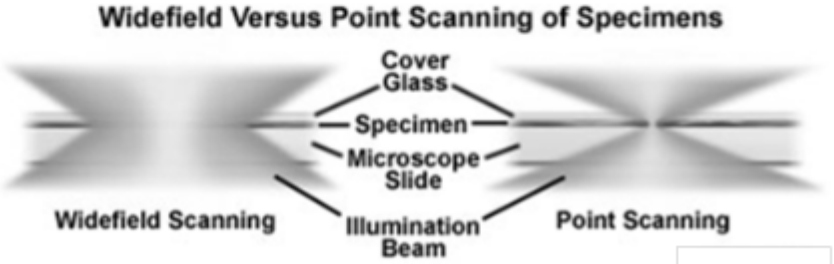
Laser Scanning Confocal Microscopy	Spinning Disk Confocal Microscopy
Nutnost snímat obraz bod po bodu → delší doba rastrování = max. 30 snímků/s	V jednom okamžiku snímáno více bodů → obraz rastrován 100–1000krát rychleji
Fotonásobič schopný detekovat pouze 15–45 % fluorescence = zvýšení rychlosti skenování snižuje množství fotonů, které dopadnou na fotonásobič a tím zvyšuje šum ve výsledném obrazu → nutno využít vyšší excitační energii laseru	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
Postupné snímání bodů → lepší axiální rozlišení (v ose Z)	„Pinhole crosstalk“ – průchod odraženého světla skrze sousední otvory v disku → zvýšené pozadí pro tlusté vzorky a snížení axiálního rozlišení
Snadno lze využít metody FRAP, fotoaktivace a fotokonverze	Nutno zabudovat přídavný polohovatelný laser pro lokální vysvícení/aktivaci fluoroforů
→ Výhodné pro kolokalizační studie	→ Výhodné pro life imaging, zejména rychlých dynamických procesů

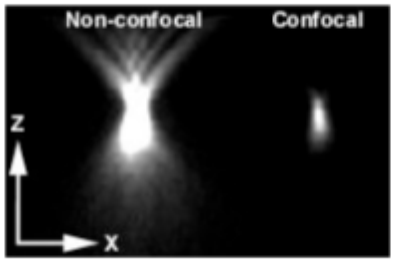
Schéma principu skenování u konfokálních mikroskopů



http://www.olympusamerica.com/seg_section/images/product/detail_full/1009_secondary_lg.jpg

Srovnání standardního (widefield) a konfokálního mikroskopu





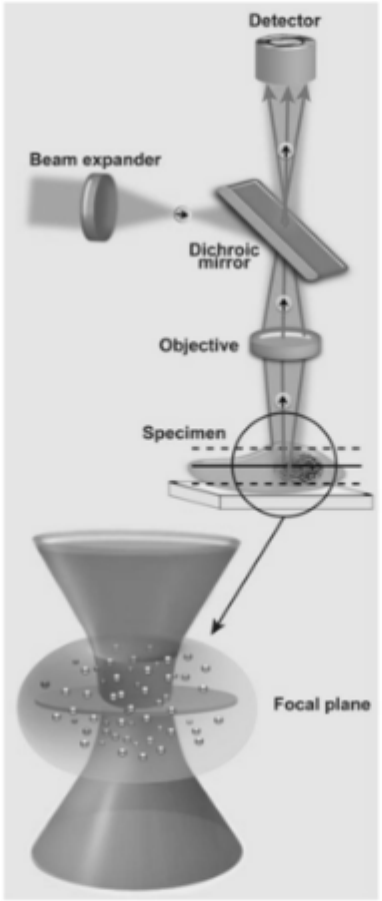
Standarní fluorescenční mikroskop

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

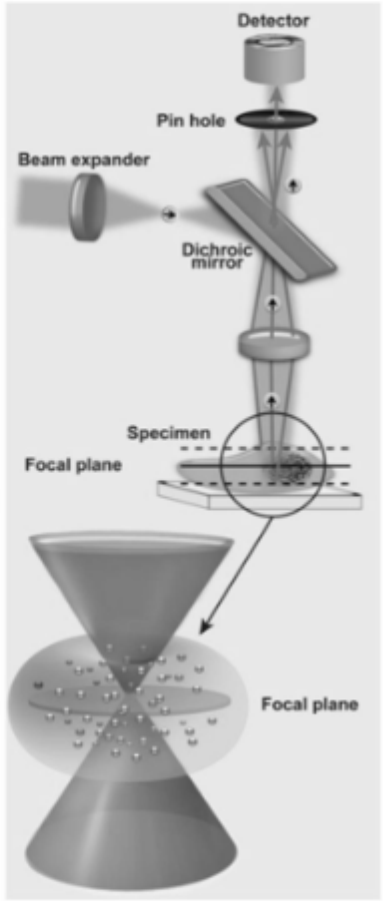
Konfokální fluorescenční mikroskop

- 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: 0,5µm

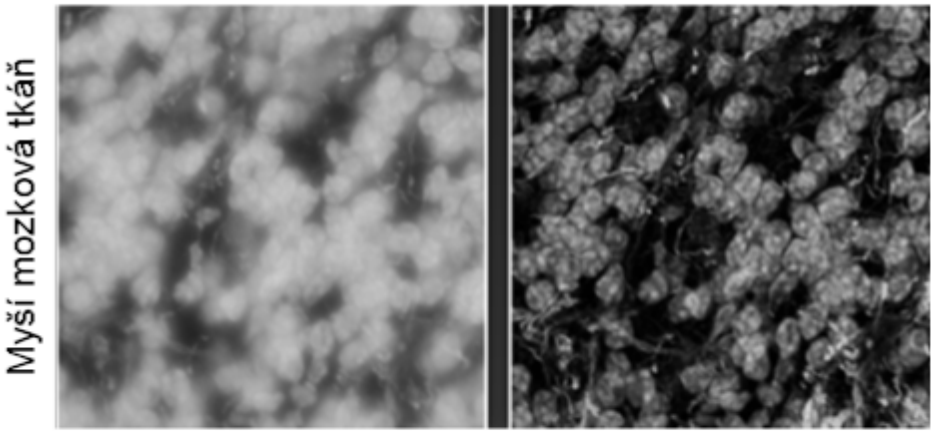
Srovnání konfokálního a standardního (widefield) mikroskopu



Standardní fluorescenční mikroskop



Konfokální mikroskop



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

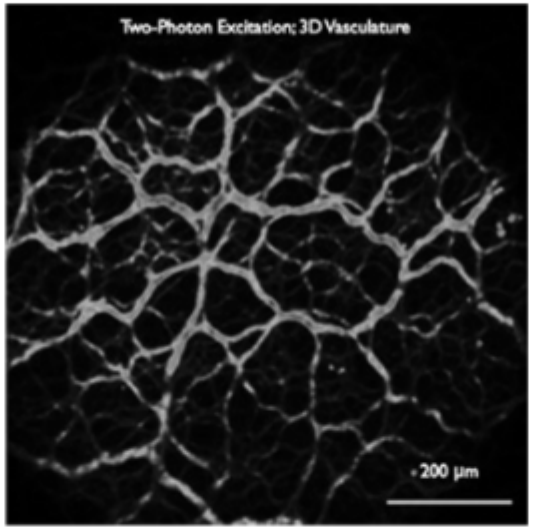
Online tutoriál 1

Multifotonová fluorescenční mikroskopie

Multiphotom microscopy (MPM)

- Metoda podobná LSCM (hardware, detektor)
- **Pozorování vzorků s velkou optickou hloubkou *in vivo*** (Pozorování nervových sítí, mikrovaskulatury atp., in vivo studie, excitace jednotlivých organel)
- 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

- dvoufotonová: využívá současné absorbce 2 fotonů k excitaci fluorochromu
- třífotonová: využívá současné absorbce 3 fotonů



https://www.youtube.com/watch?v=MFeS5ZUECDU

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 absorbce 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**

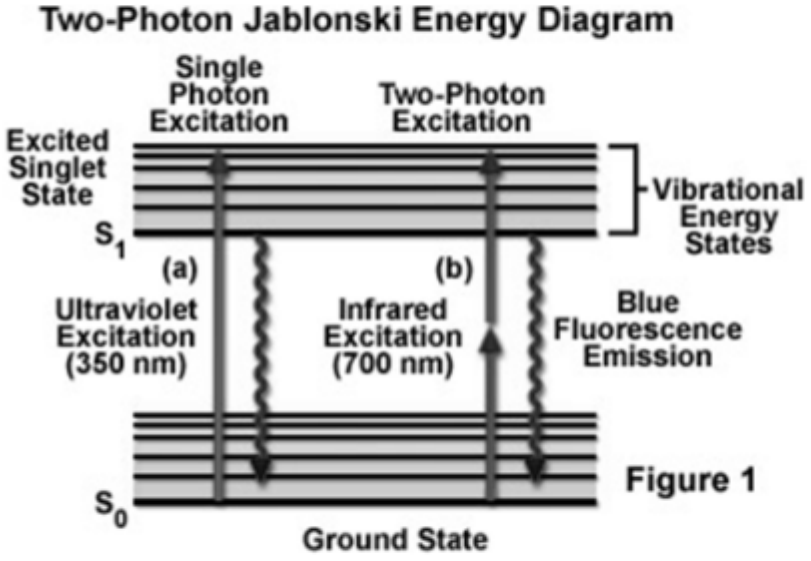


Figure 1

Dvoufotonová fluorescenční mikroskopie

- excitace fluoroforu zejména v místě zaostření paprsku laseru (je zde vyšší pravděpodobnost absorbce 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)

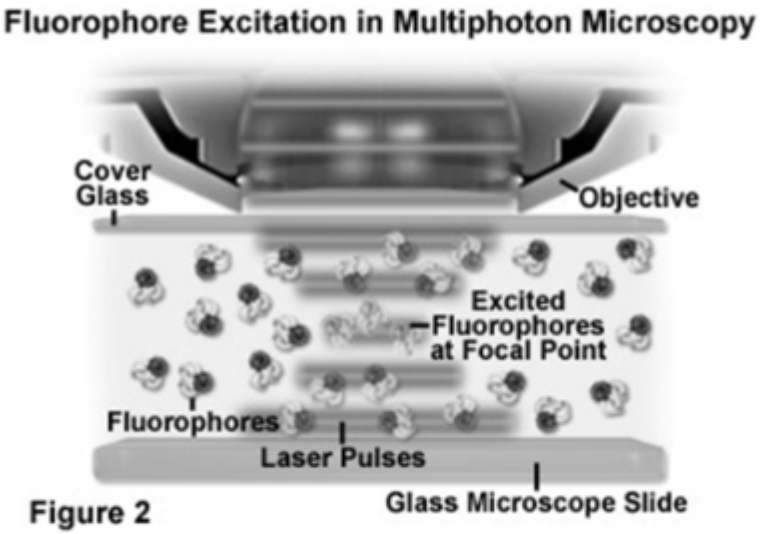
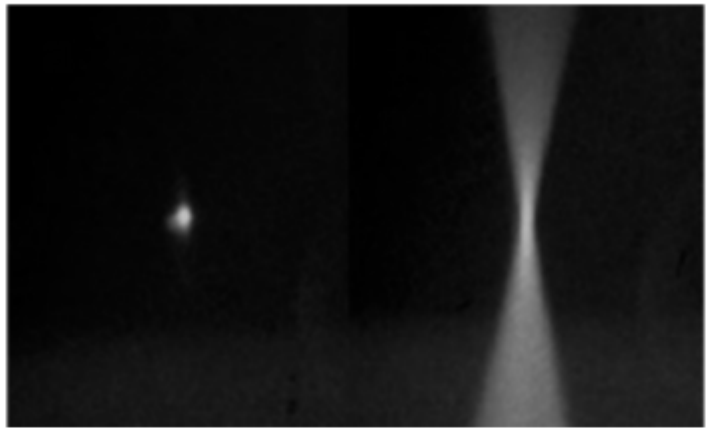
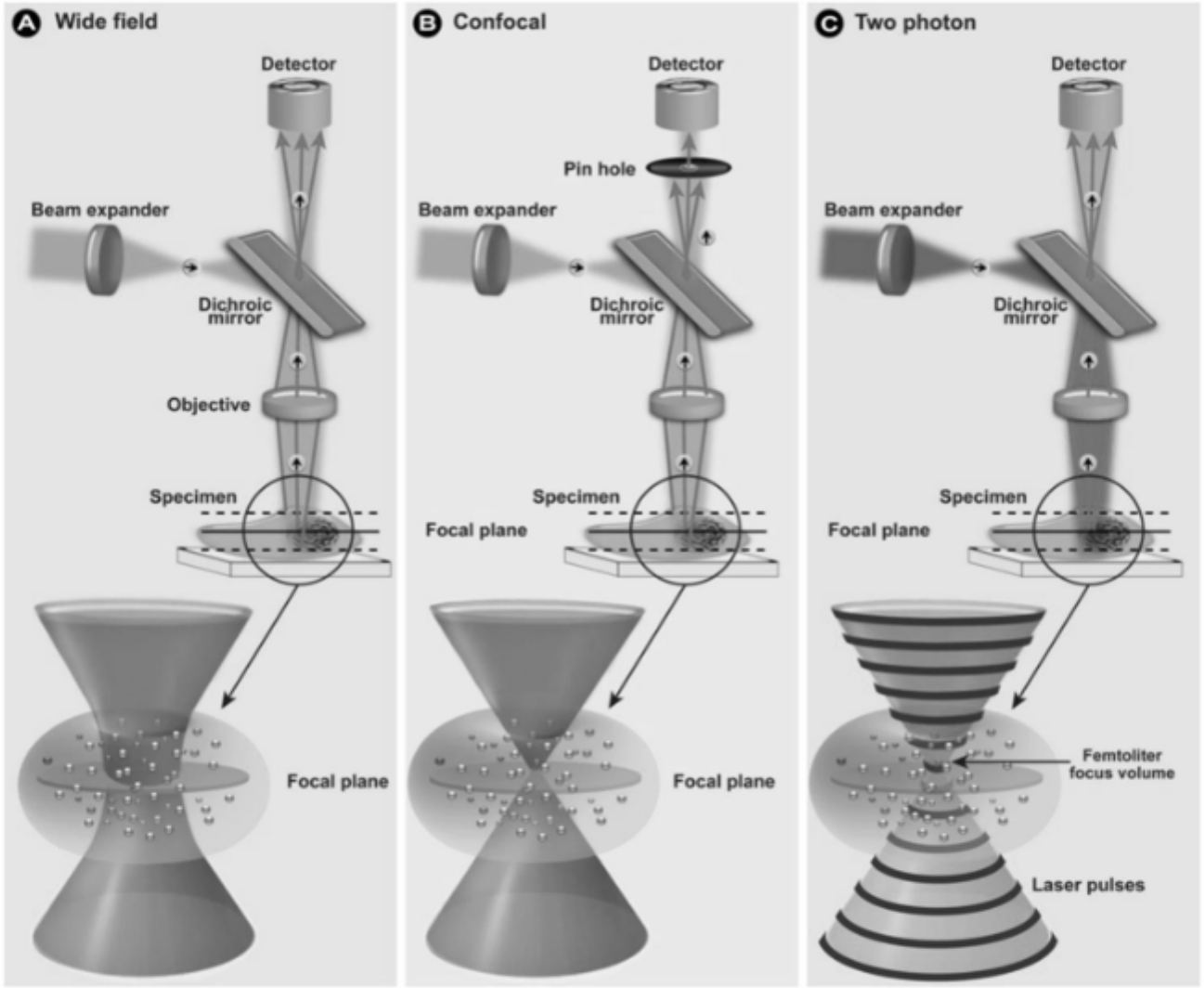


Figure 2



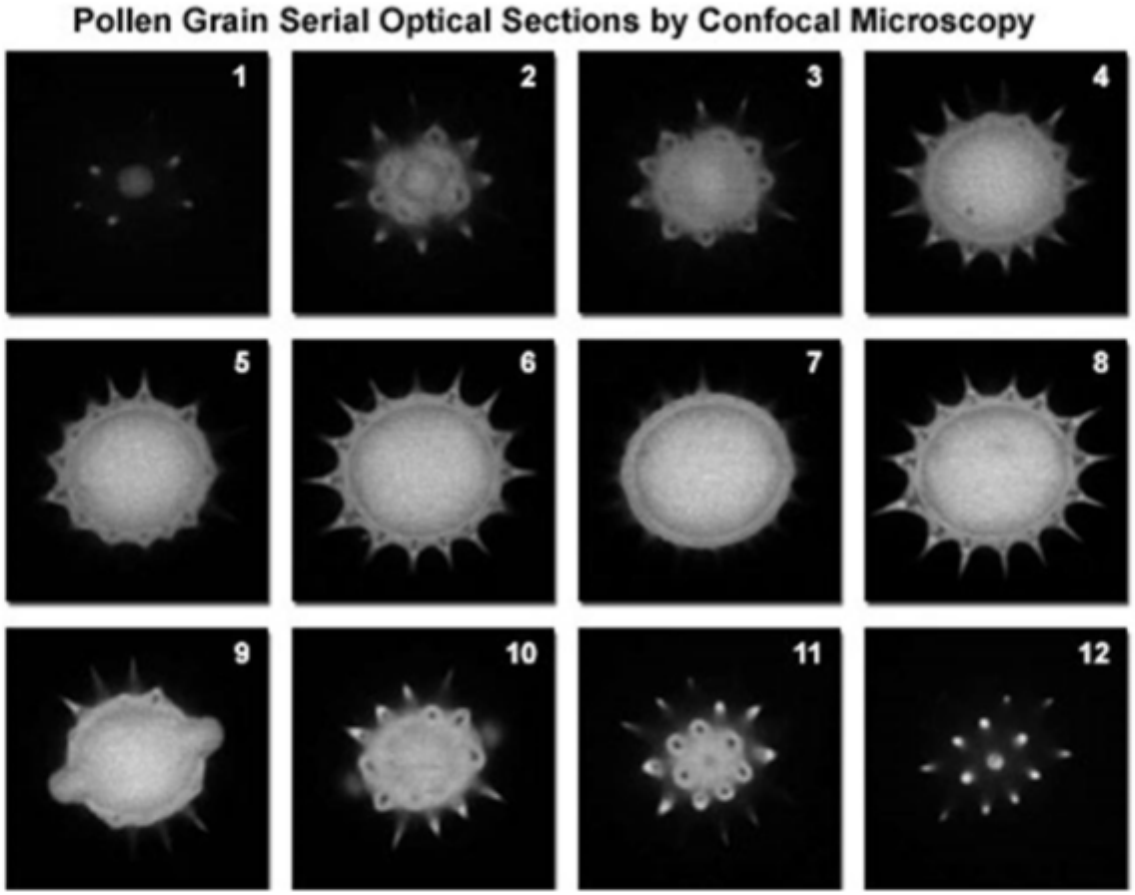
Emise fluorescence v ose Z v rámci preparátu
a) dvoufotonový mikroskop (v místě zaostření)
b) konfokální mikroskop (v celé hloubce preparátu)

Wide-field vs. Confocal vs. Multi-photon



Možnosti zobrazení

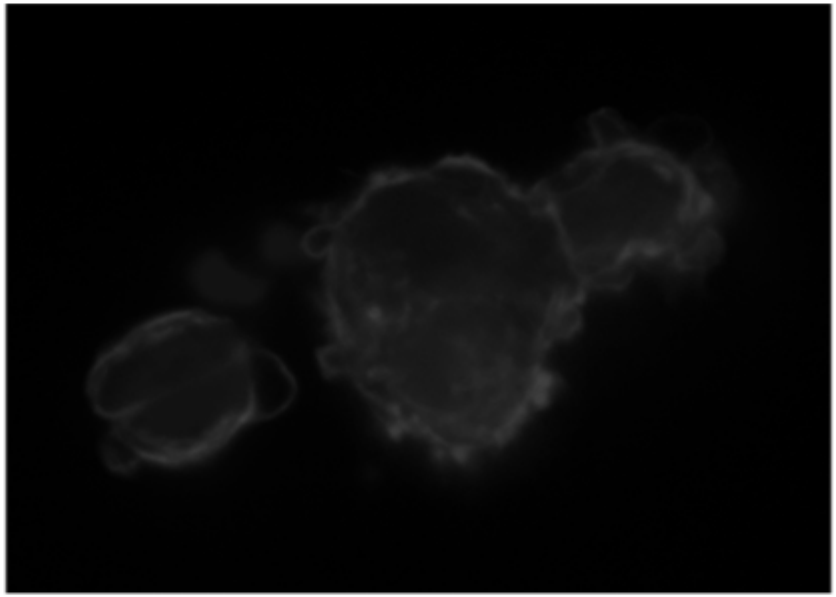
- 1 optická rovina (řez)



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

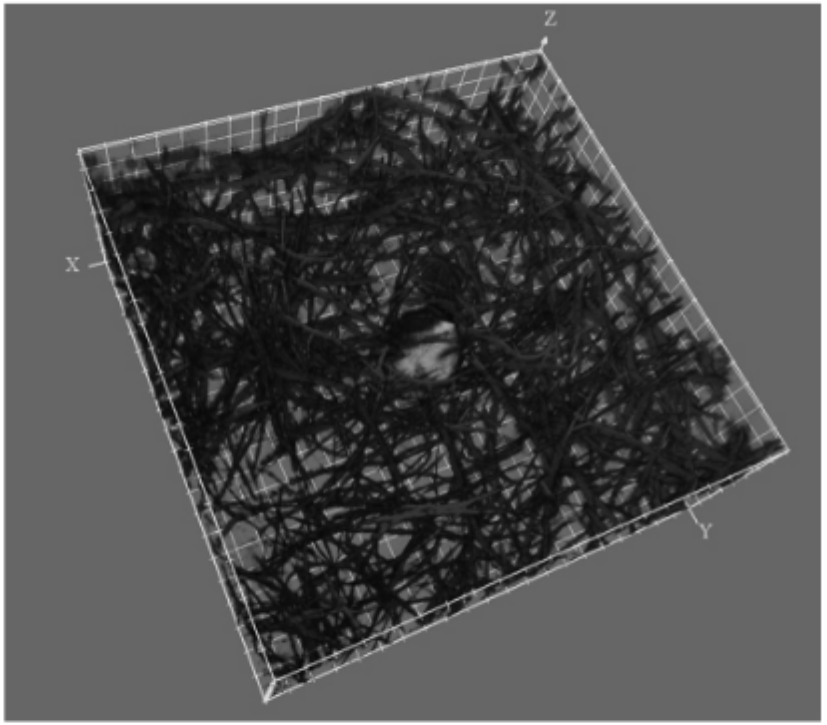


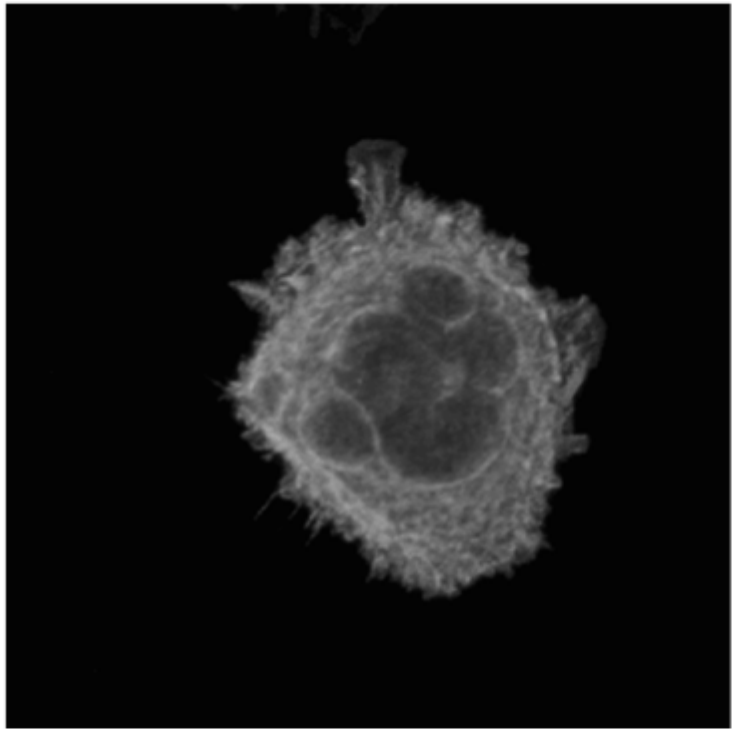
apoptotické buňky linie P19,
modrá: DAPI; červená: phalloidin-TRITC

Možnosti zobrazení

3D zobrazení

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

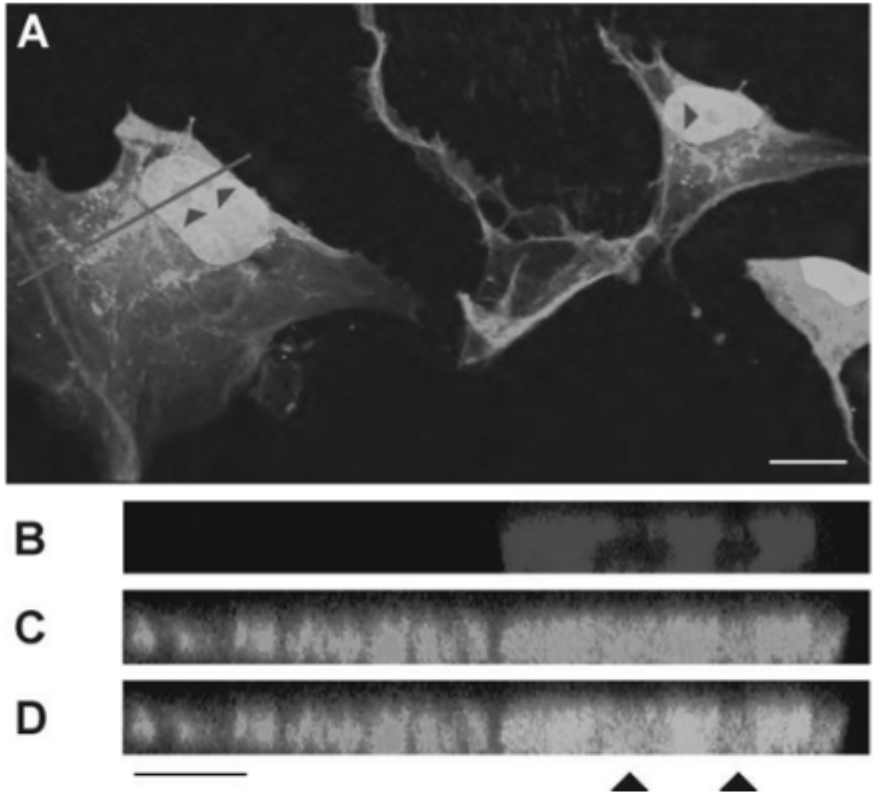




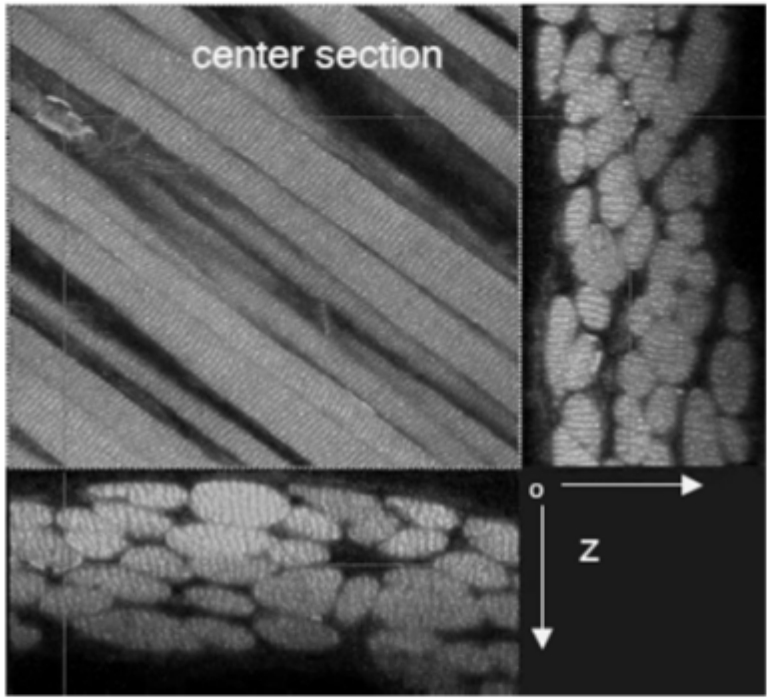
Možnosti zobrazení

X-Z, Y-Z zobrazení

- Ze souboru horizontálních řezů lze rekonstruovat vertikální optické řezy vzorkem - lze vidět preparát „z boku“



detekce nestinu v buňce glioblastomu



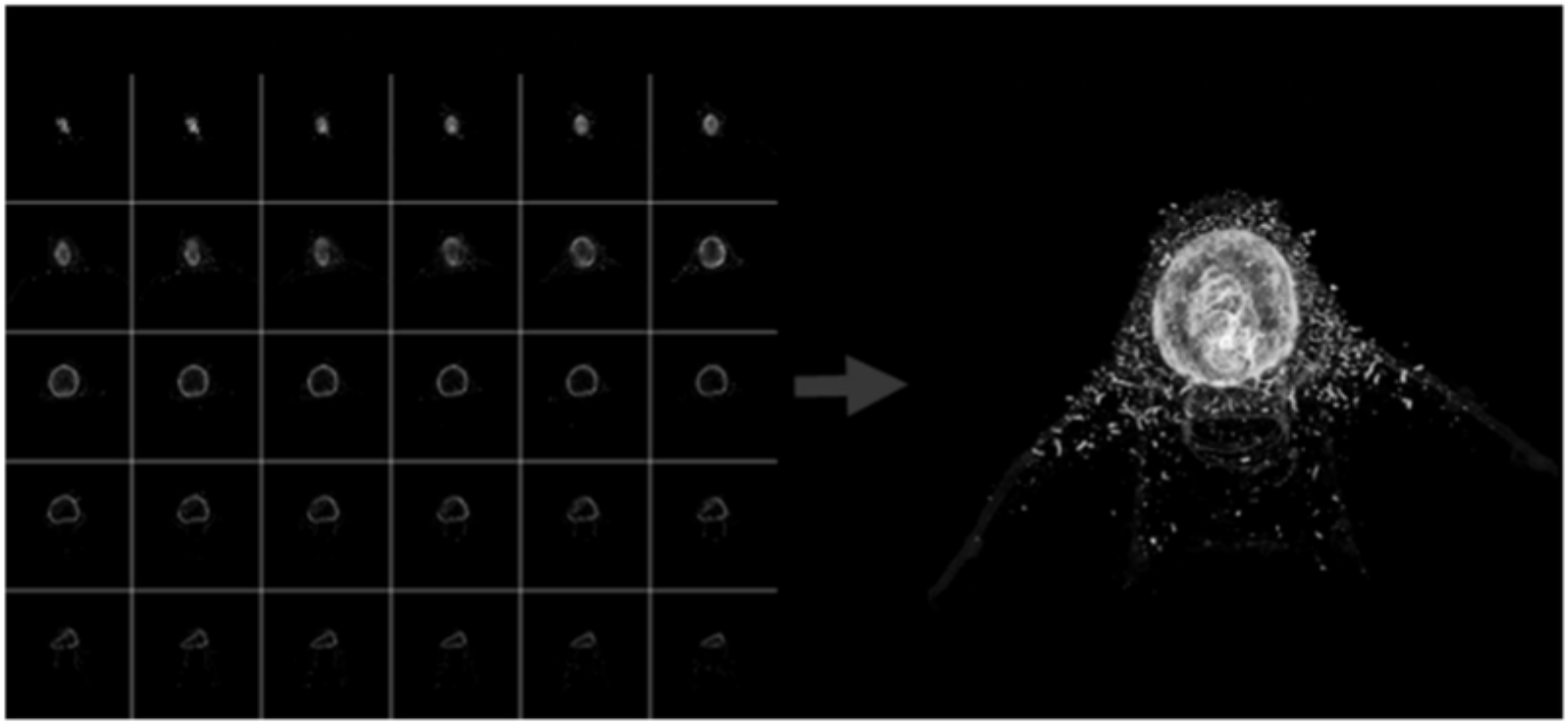
svalová vlákna

Možnosti zobrazení

Maximum intensity projection (MIP) ze souboru horizontálních řezů

Gallery view of 3 color Z-stack

Maximum intensity projection



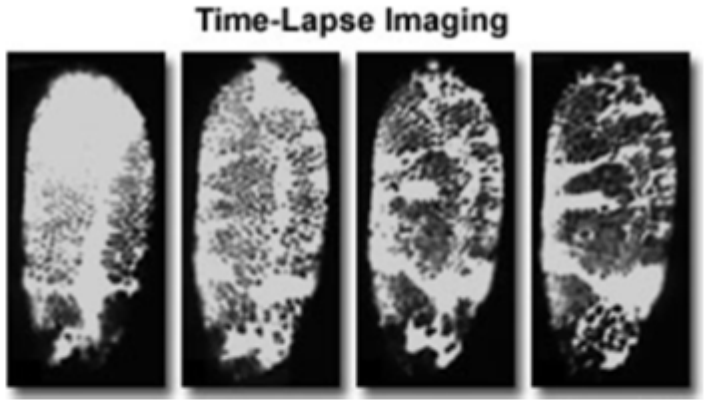
http://microscopy.duke.edu/3D

Možnosti zobrazení

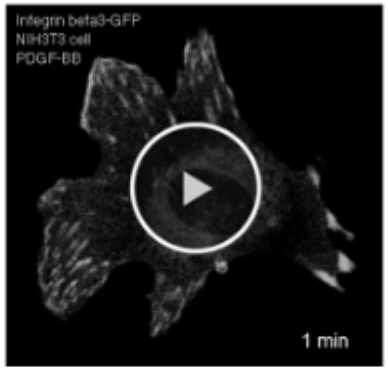
Časosběrné snímání a zobrazení živých buněk (objektů), 4D

- 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

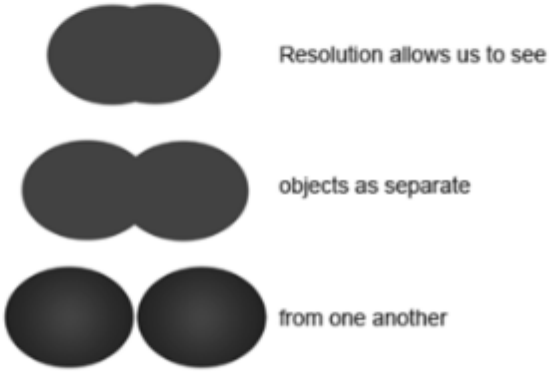


Živé embryo
D. melanogaster po injekci calcium green – změny distribuce v čase



Rozlišovací schopnost mikroskopu

- minimální vzdálenost dvou bodů objektu, které se ještě zobrazí jako navzájem oddělené, tzn. nesplynou v jeden bod

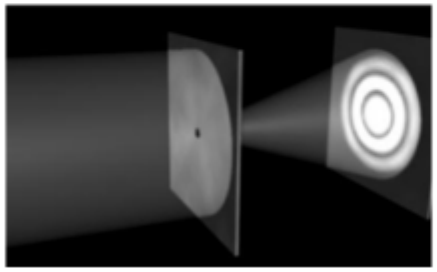


Rozlišovací schopnost mikroskopu ovlivňují:

- **difrakce světla** - ohyb světla na štěrbině nebo překážce
- numerická apertura objektivu
- 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



Diffraction of Coherent Laser Light

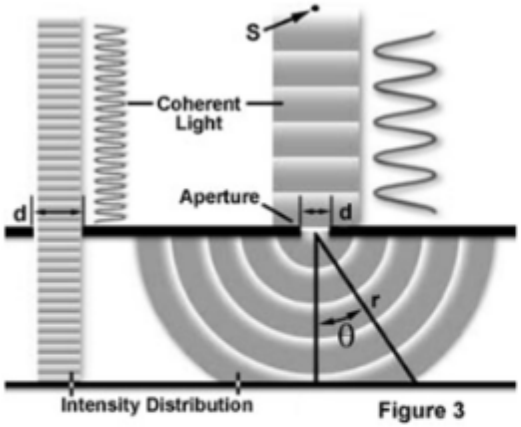


Figure 3

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

Konvoluce – praktické dopady

Žádný objektiv nemůže zobrazit bodový objekt opět jako bod. Obrazem bodu jsou Airyho kroužky/disky - difrakční obrazec vznikající ohybem zobrazujícího se světla na čočkách objektivu.
Airyho kroužky limitují rozlišení jednotlivých bodů v mikroskopu.

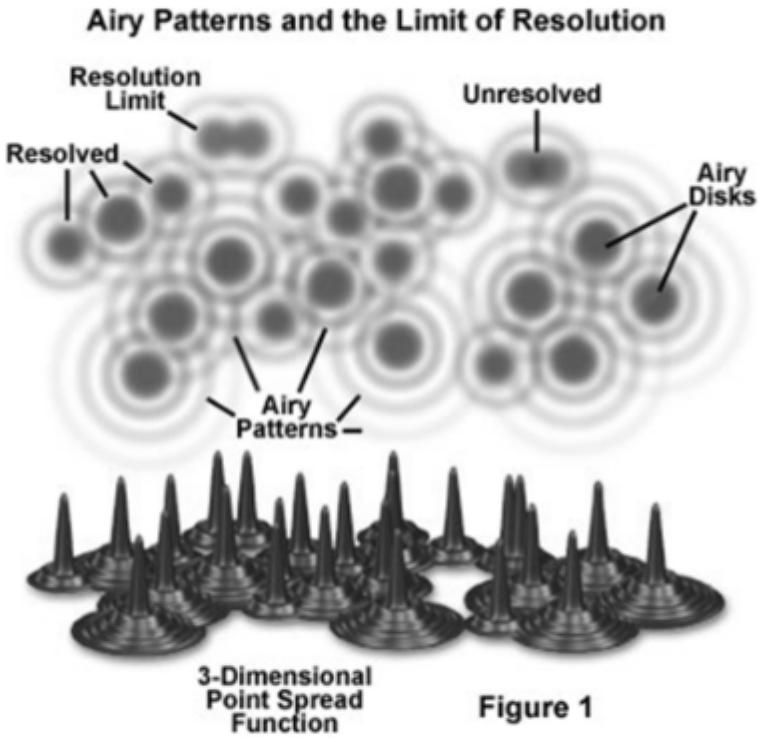
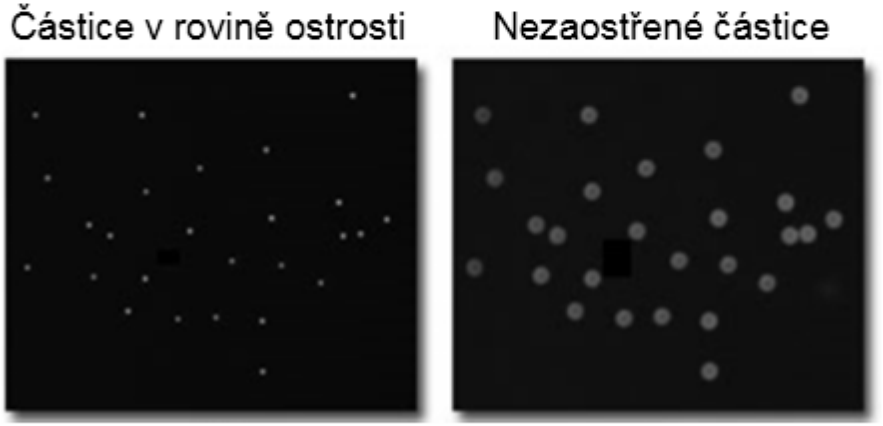
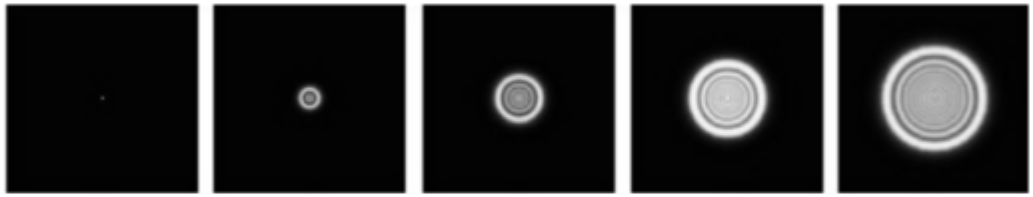


Figure 1

Vliv zaostření na velikost Airyho disku





Rozptylová funkce (point spread function, PSF)

- matematická funkce, která popisuje tvar, do nějž se v mikroskopu vykreslí bodový zdroj světla
- při zobrazení v ploše ji popisuje Airyho funkce
- Sestává se z nejintenzivnějšího maxima prvního řádu, okolo nějž 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
- .

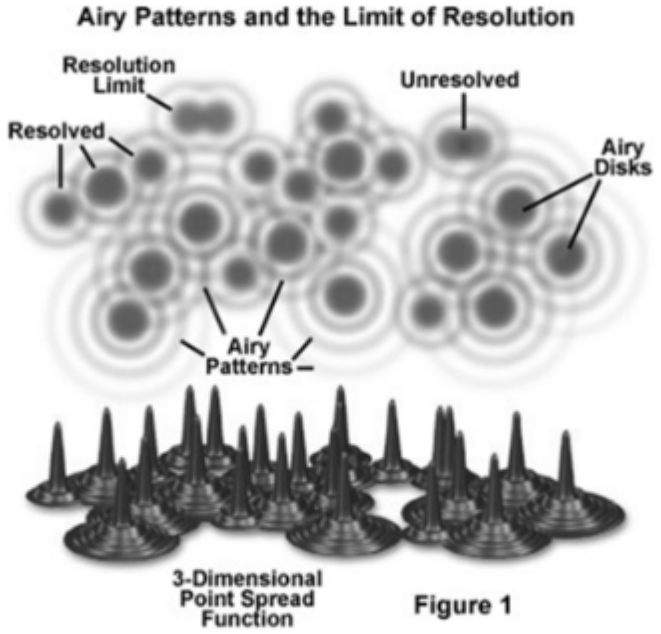
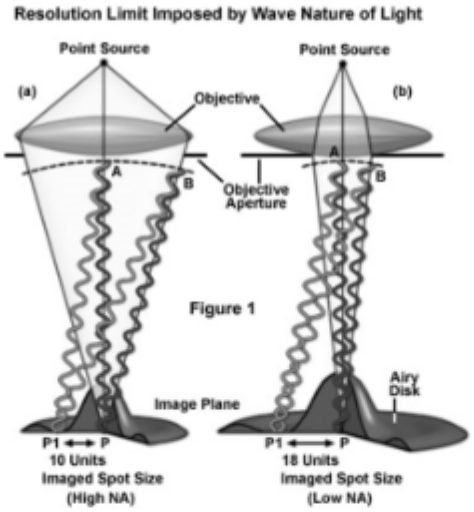


Figure 1



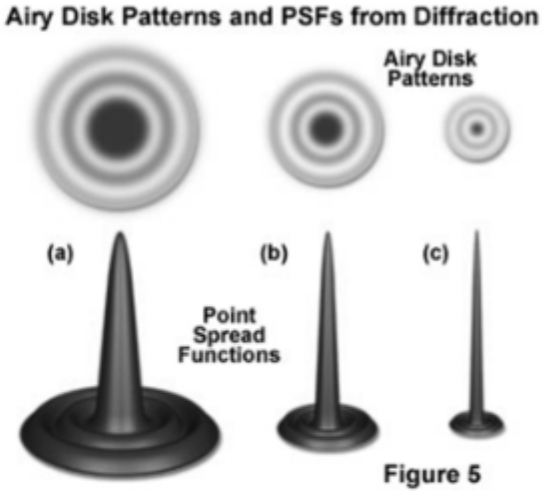
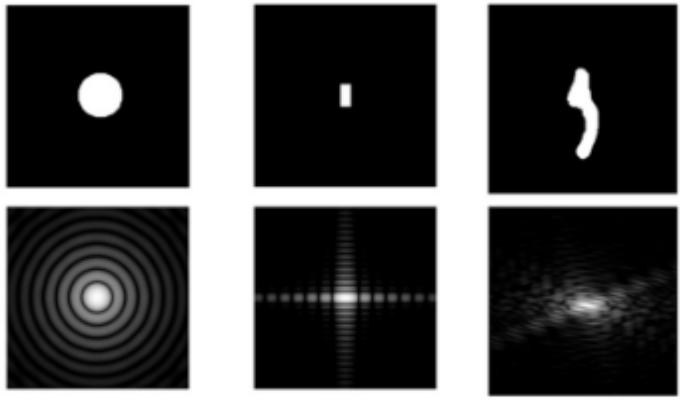
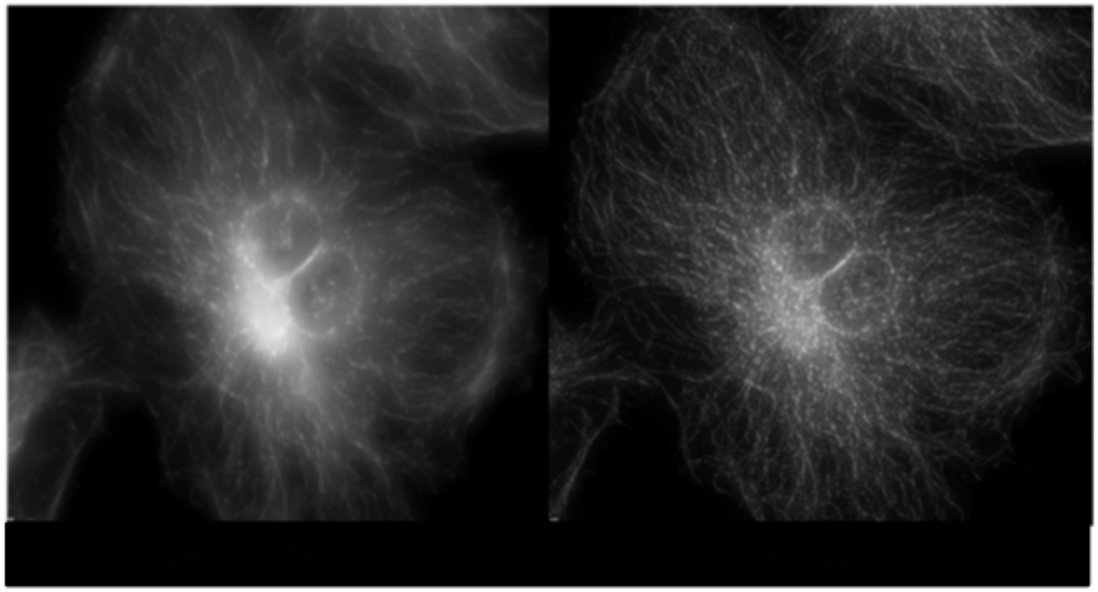


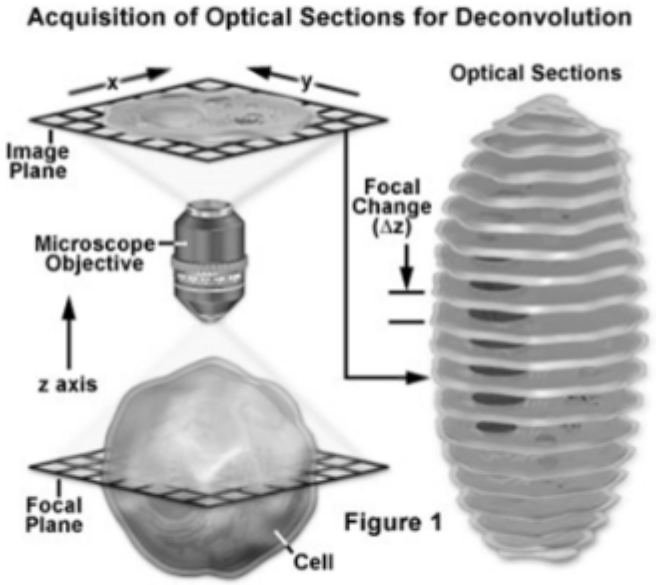
Figure 5



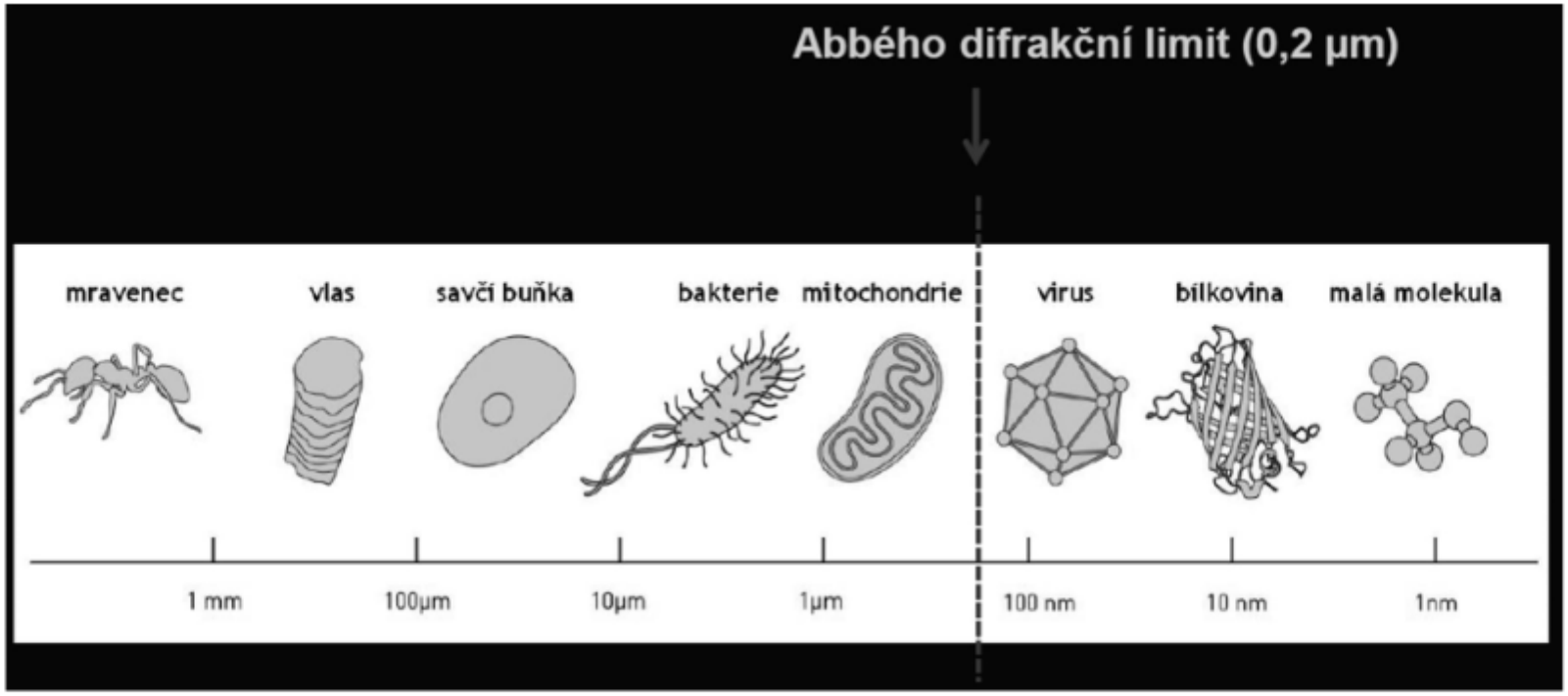
Dekonvoluce

- **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





Maximální rozlišení optického mikroskopu - difrakční limit



http://e-svet.e15.cz/technika/nobelova-cena-za-chemii-patri-vynalezcum-nanoskopie-1125912

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„
- Odůvodnění rozhodnutí Královské švédské akademie věd: "Vyvinutím fluorescenčního mikroskopu s velmi vysokým rozlišením přeměnili optickou mikroskopii do nanoskopie

Superrozlišovací mikroskopie

- Nevýhody elektronové mikroskopie:
  - vzorek je vždy fixovaný
  - metoda je náchylná k tvorbě artefaktů
  - značení konkrétních molekul je složité

- Výhody superrezoluce:
  - vzorek může být živý
  - zpracování vzorku je jednoduché
  - (ko)lokalizujeme konkrétní molekuly

- Druhy rezoluce:
  - Vylepšená geometrie fluorescenčního mikroskopu (konfokální, SIM, 4Pi)
  - Stimulovaná deplece emise (STED)
  - Lokalizace jednotlivých molekul (PALM, STORM)

Přehled superrozlišovacích metod

Metody dalekého pole (Far-field) (zobrazení vnitřních struktur vzorku)

- Konfokální zobrazování
  - 4Pi mikroskopie
  - STED - Stimulated Emission Depletion
- Celoplošné zobrazování (Wide-field)

  Mikroskopie se strukturním osvětlením
  - SIM - Structured Illumination Microscopy

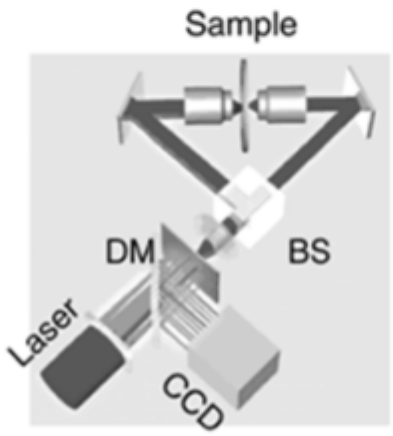
  Lokalizační mikroskopie (stochastická lokalizace):
  - STORM - Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
  - PALM - Photoactivation Localization Microscopy
  - FPALM - Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy
  - GSDIM - Groud State Depletion followed by Individual Molecule return (NC 2014, Eric Betzig a William Moerner)

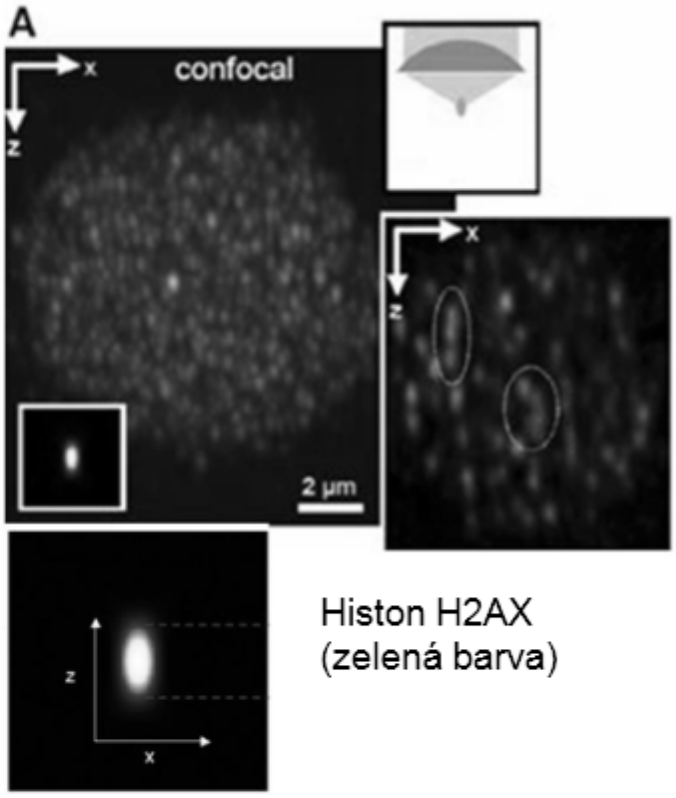
Metody blízkého pole (Near-field) (zobrazení povrchu vzorku)

- NSOM - Near-field Scanning Optical Microscopy

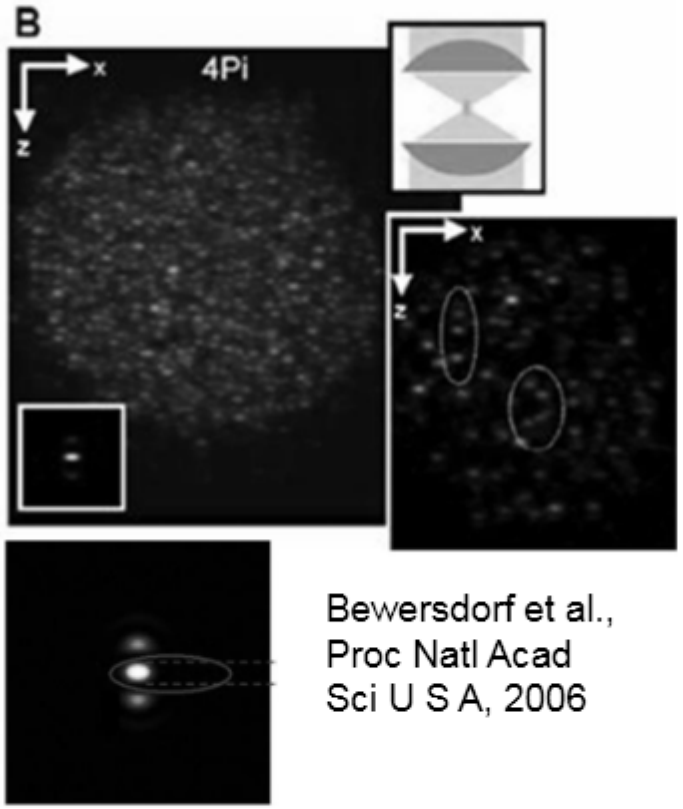
4pi mikroskopie (1991 – vynalezl Stefan Hell)

- 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





Histon H2AX
(zelená barva)

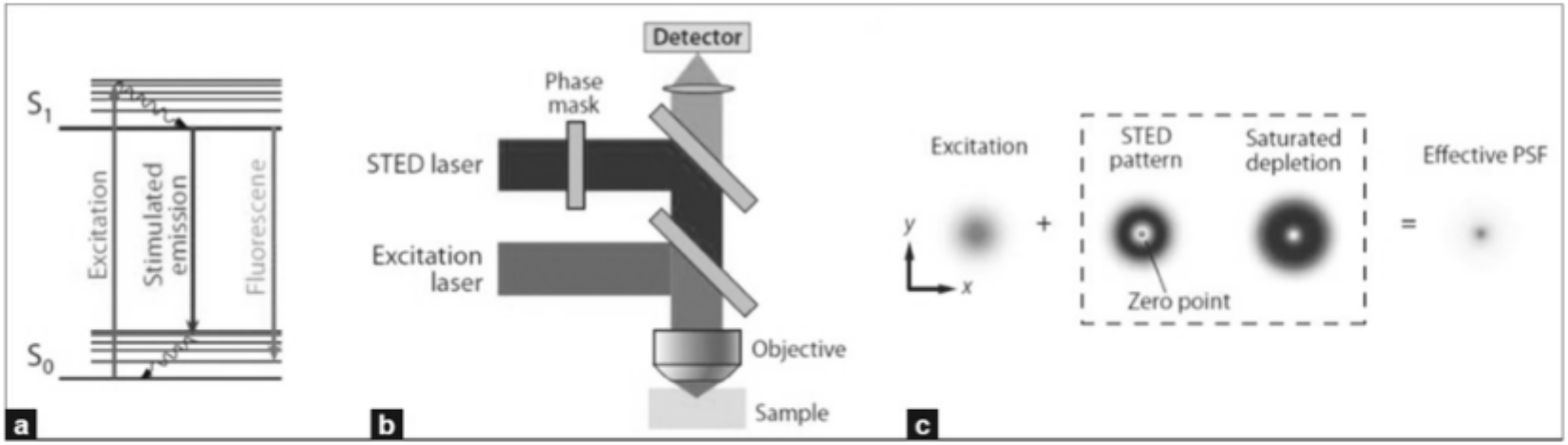


Bewersdorf et al.,
Proc Natl Acad
Sci U S A, 2006

Vyčerpání stimulovanou 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

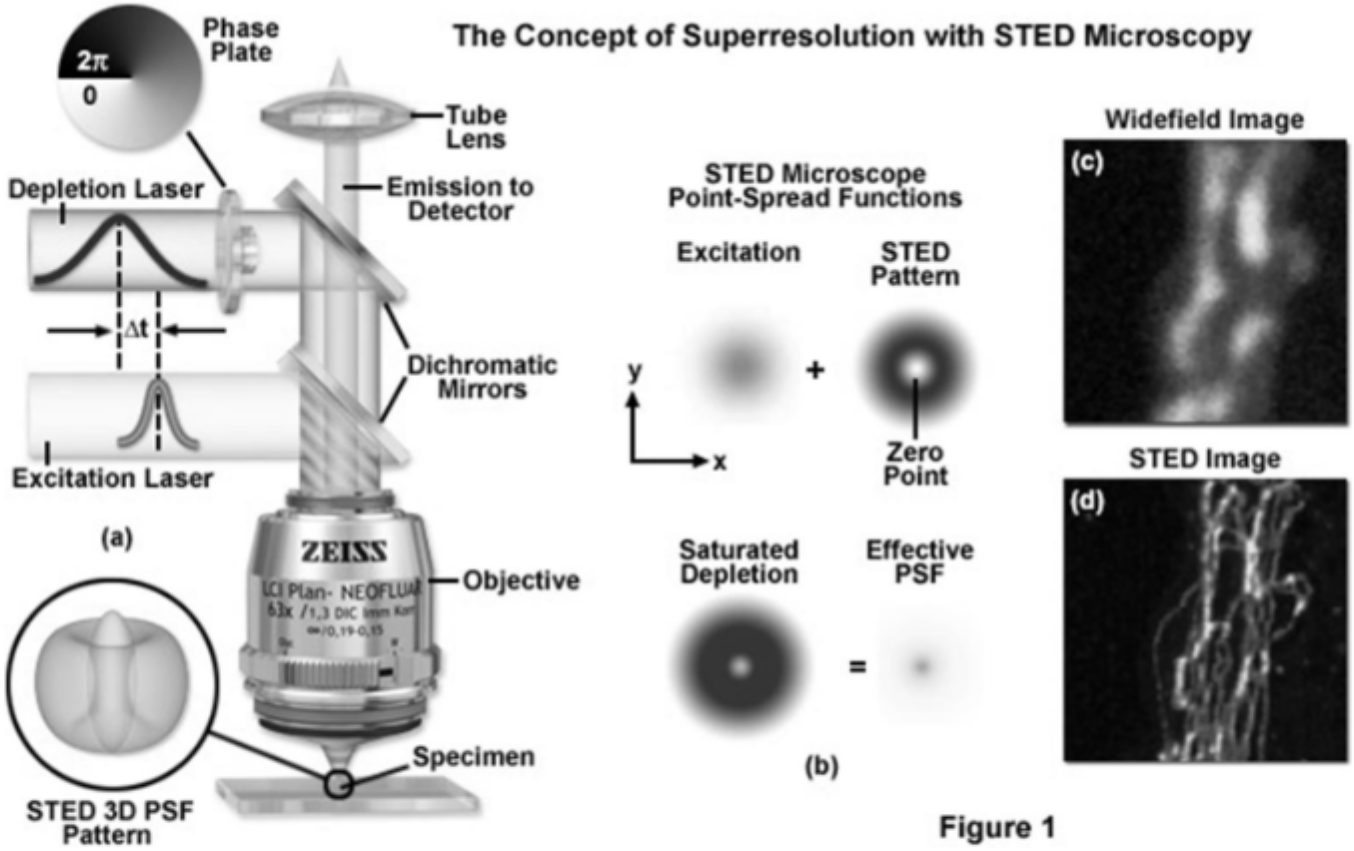
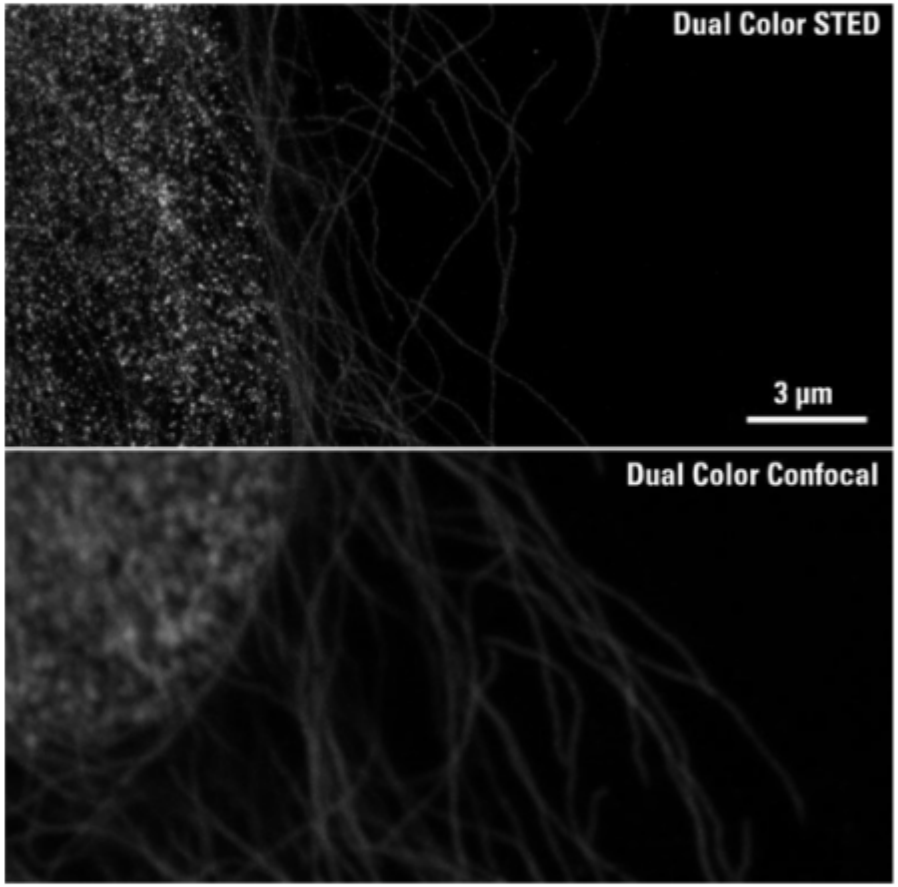
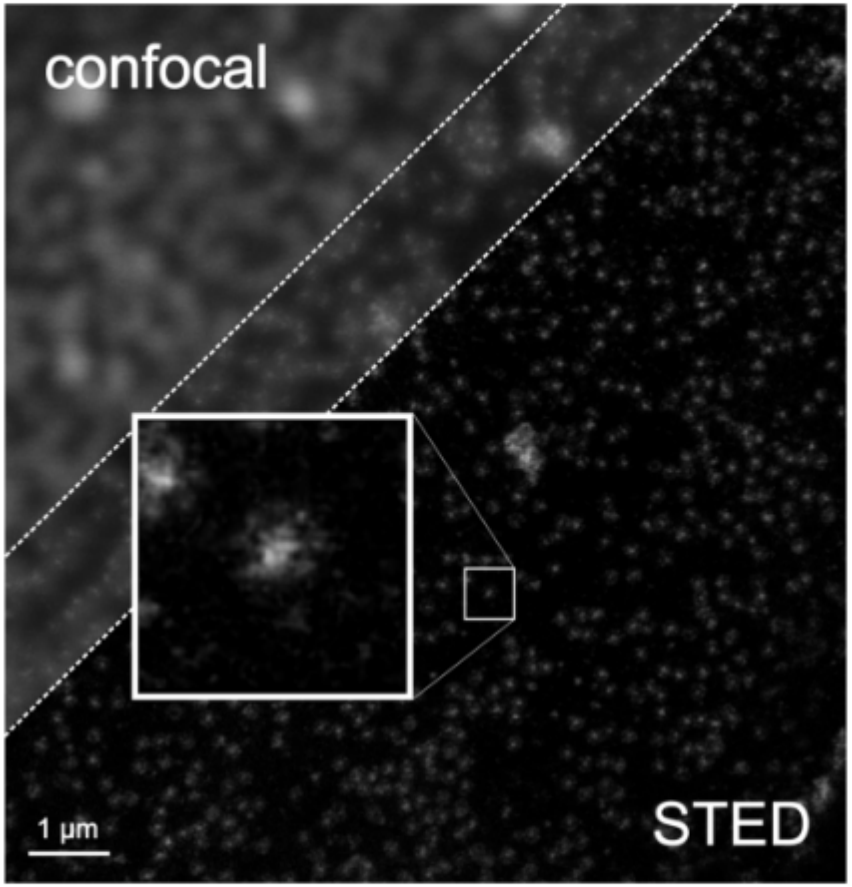


Figure 1

STED



Histon H3 (zelená); mikrotubuly (červená)



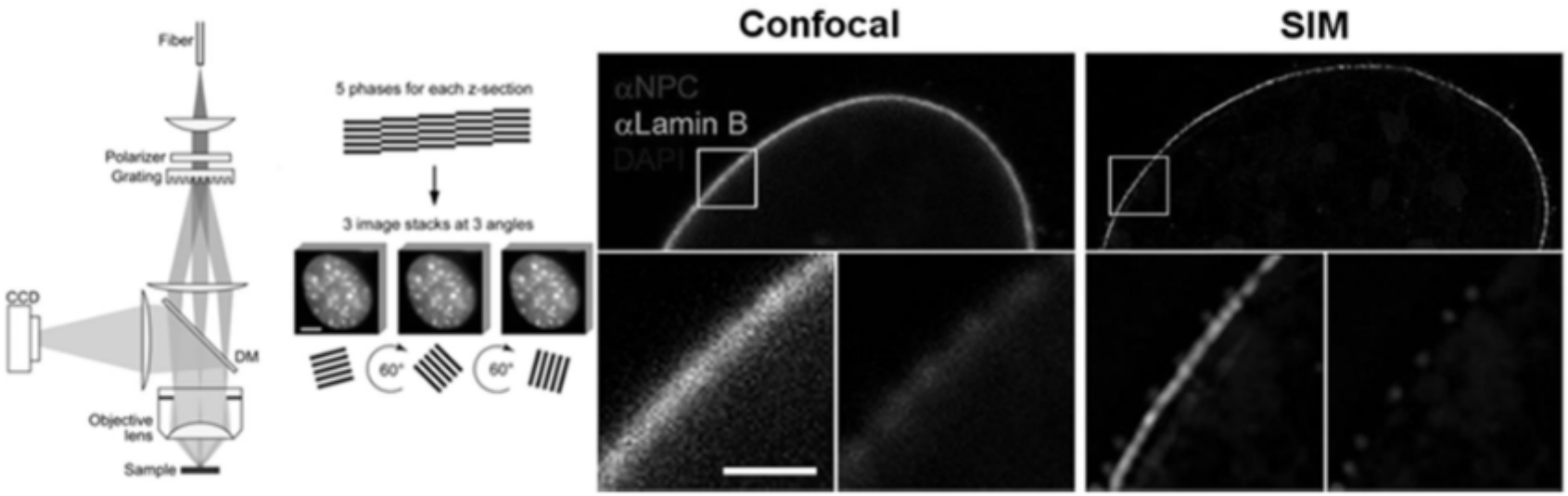
Proteinové komplexy jaderného póru

https://www.youtube.com/watch?time_continue=4&v=B4m_Y747gzw

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



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)

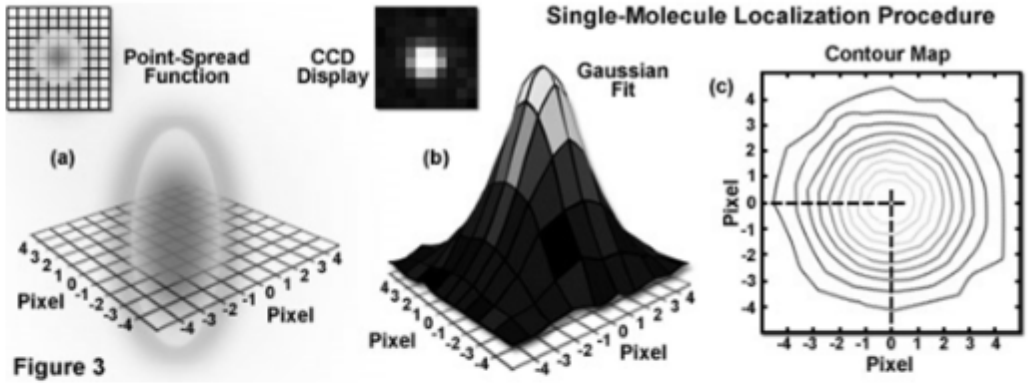
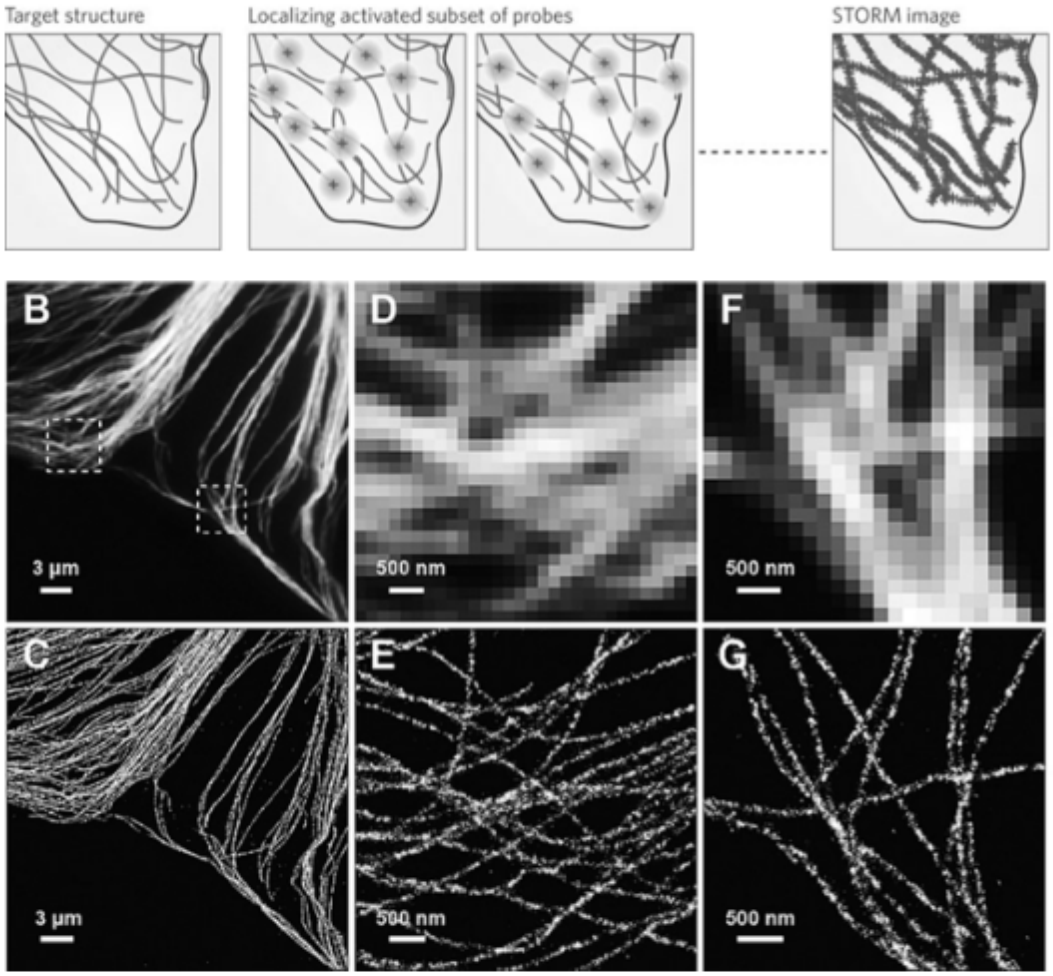


Figure 3

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**

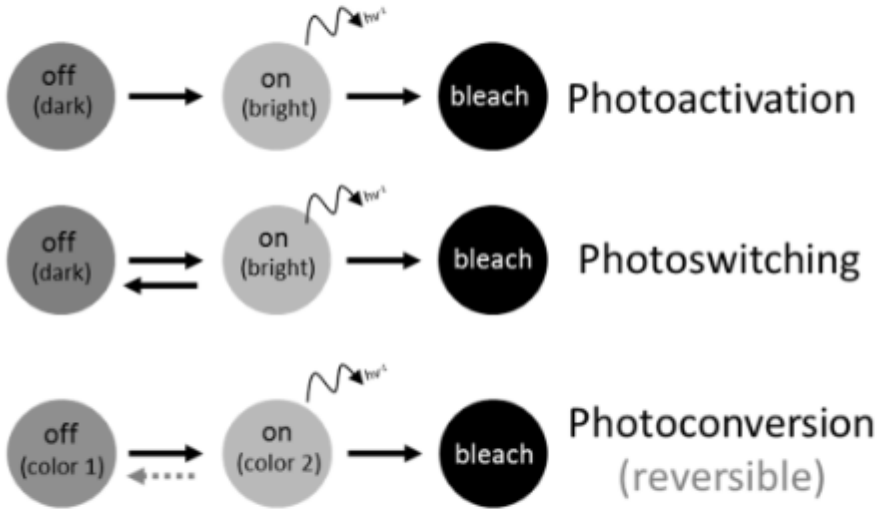
Single-Molecule Superresolution Imaging

- 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)

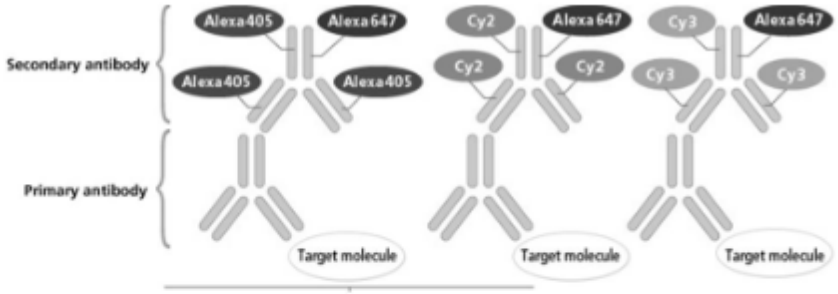
- fotoaktivace (photoactivation)
- „fotopřepínání“ (photoswitching)
- fotokonverze (photoconversion)

- **použití laseru s nízkou intenzitou**
- jednotlivé molekuly fluorochromů – nízká pravděpodobnost zásahu a změny stavu (off→on)

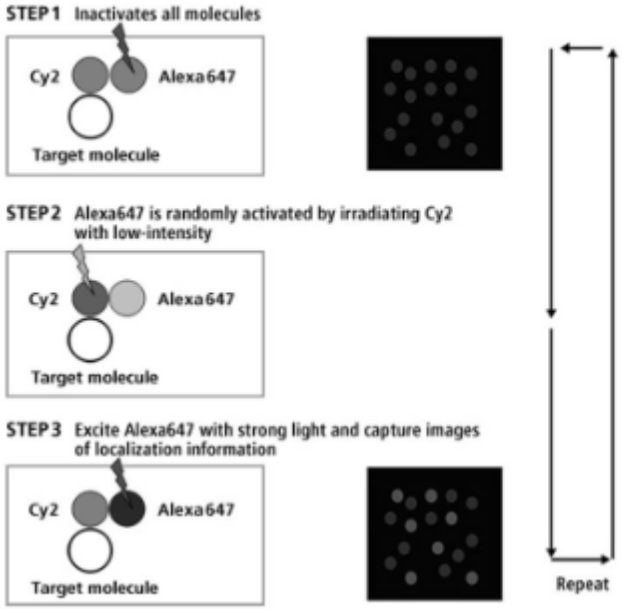


Single-Molecule Superresolution Imaging

Systém **dvojice fluorochromů: aktivátor + „photoswitchable“ reportér**



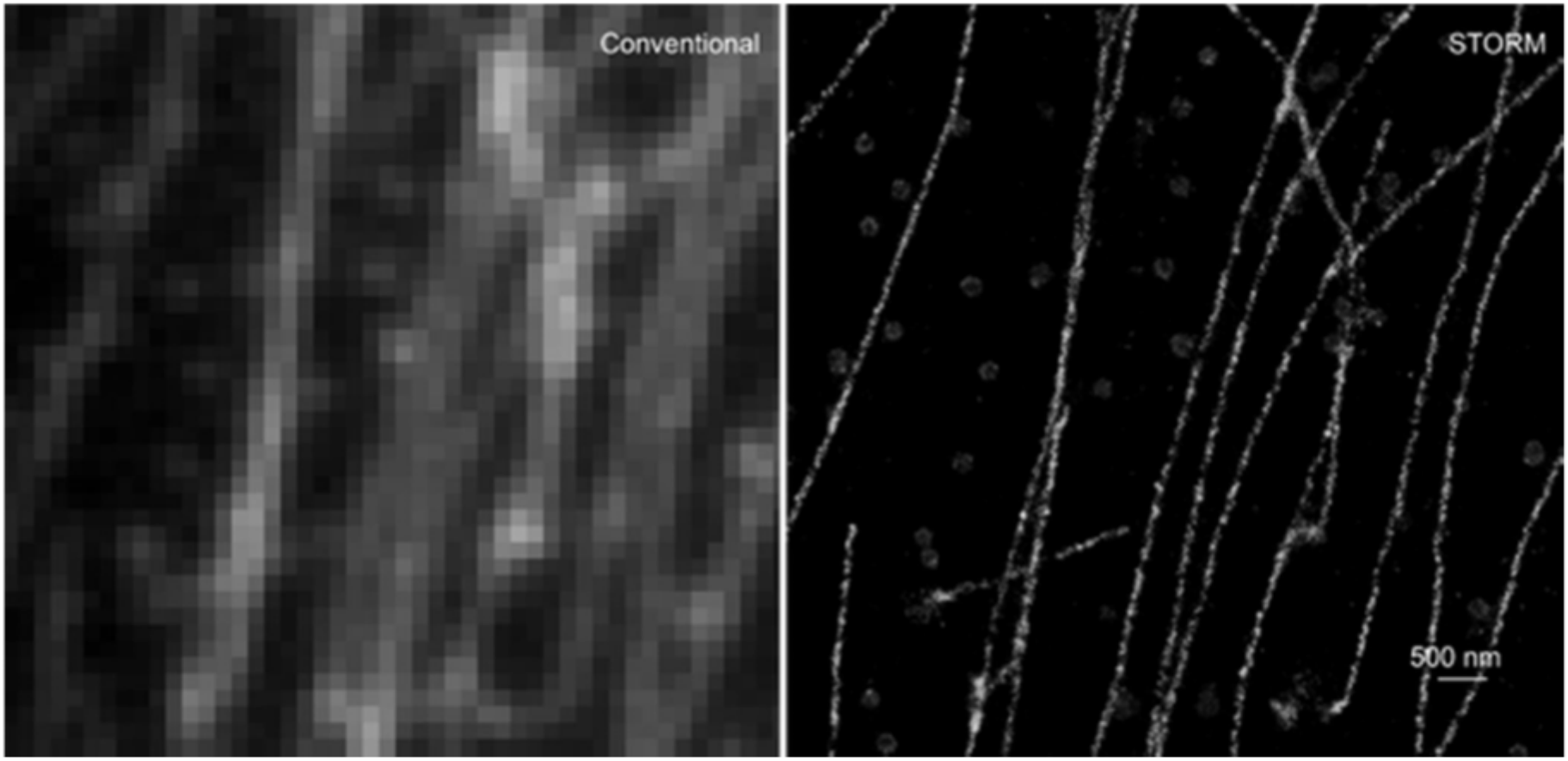
Dye for activation	Dye for image capturing
Alexa405	Alexa647
Cy2	Alexa647
Cy3	Alexa647



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

Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)

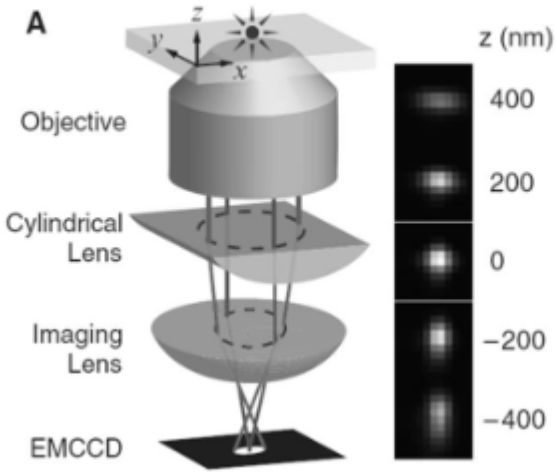
- laterální rozlišení <10 nm, axiální rozlišení <20 nm

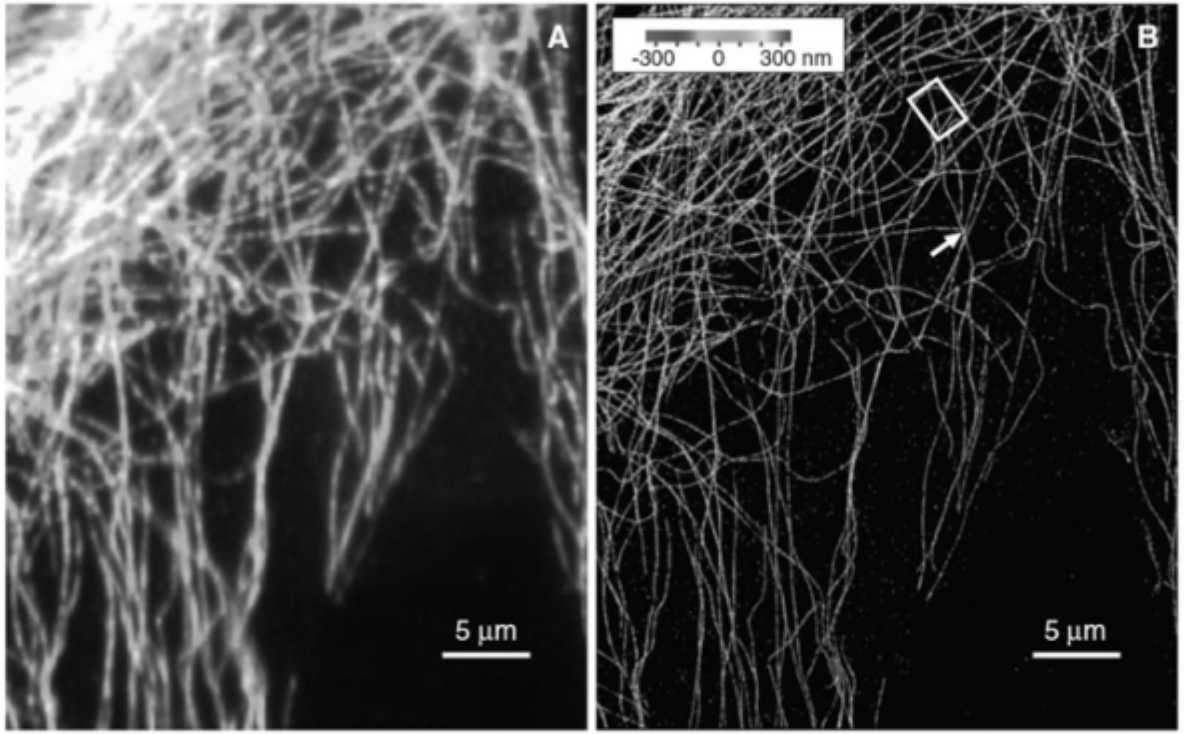


Mikrotubuly (zelená), klatrinem potažené jamky (červená; clathrin-coated pits)

3D-STORM (Huang et al., Science, 2008)

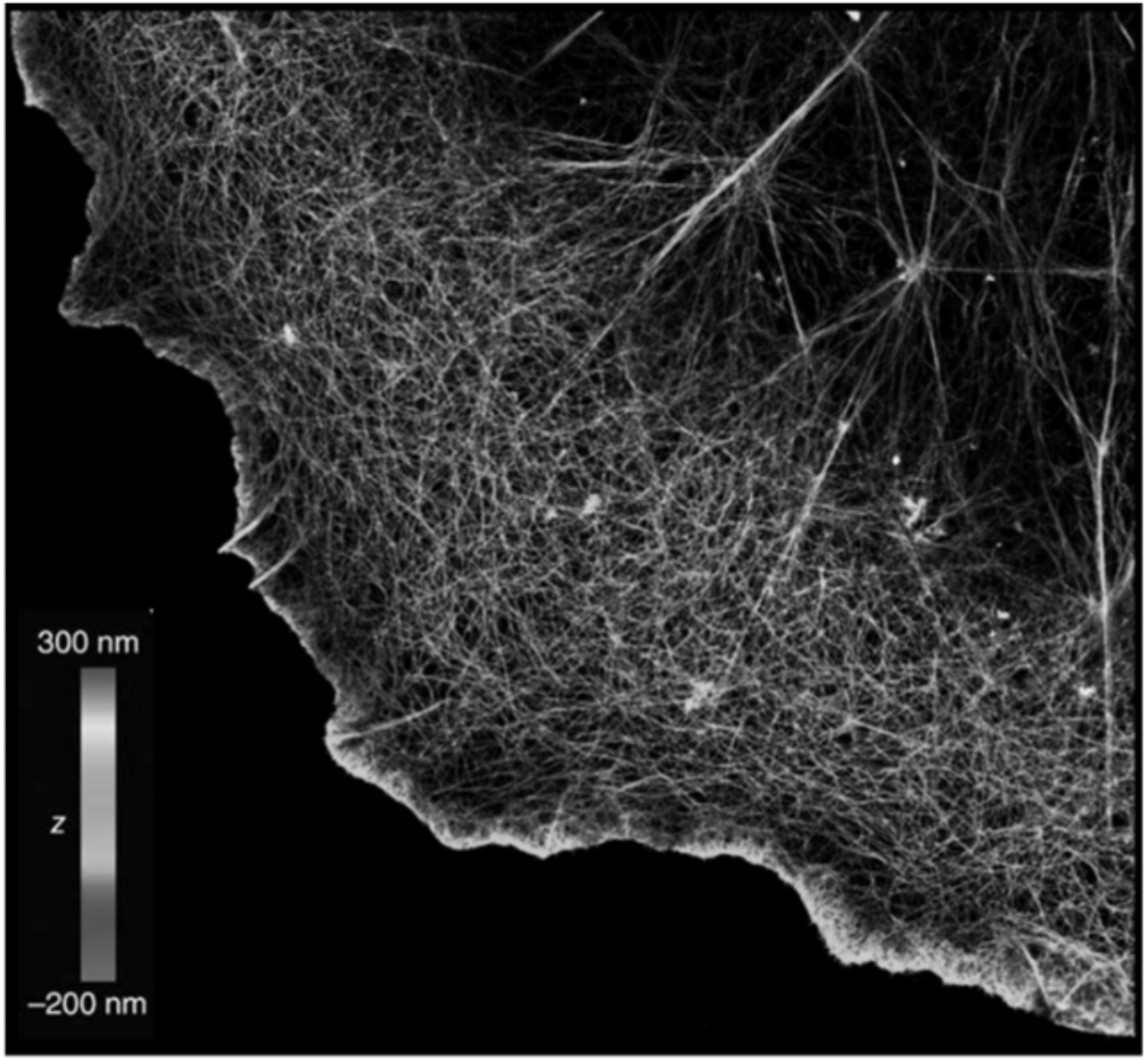
- modifikace: do objektivu přidána **cylindrická čočka – cílená změna PSF**
- lze určit pozici v rovině Z a zobrazit v rámci snímku





Mikrotubuly – pozice v Z rovině odpovídá barvě

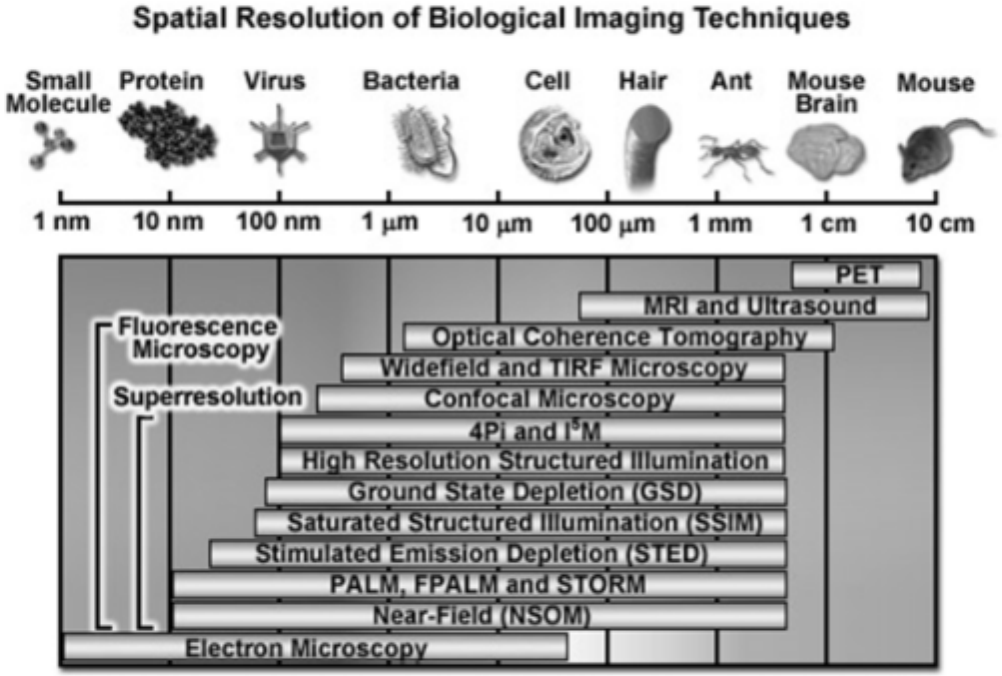
3D-STORM



Aktin – pozice v Z rovině odpovídá barvě

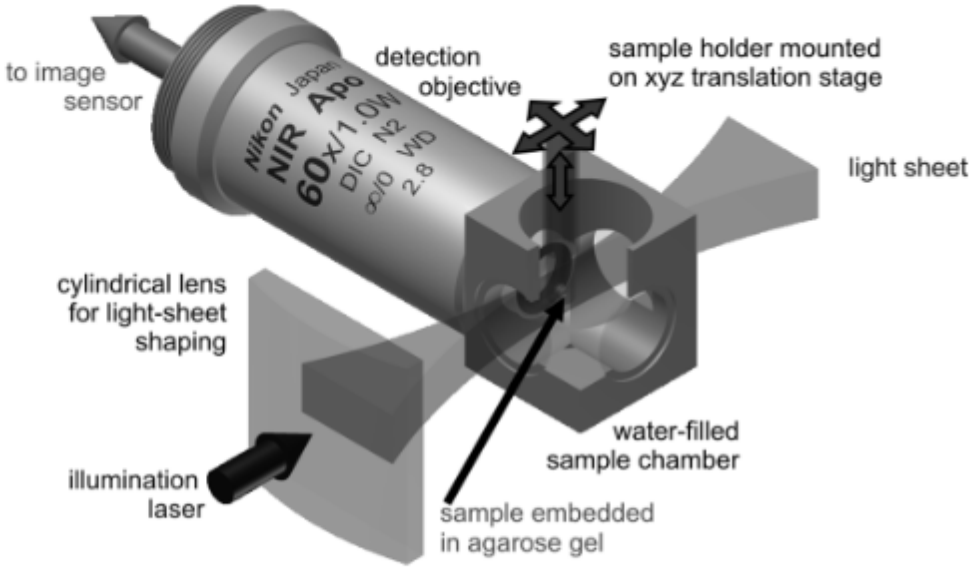
Porovnání rozlišení zobrazovacích technik

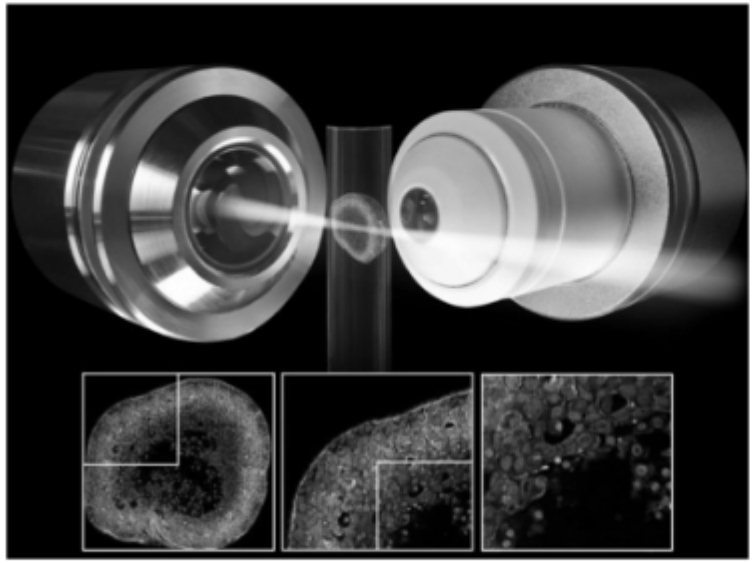
	x / y	z
• Wide-field fluorescenční MS:	230	1000 **nm**
• Konfokální a multiphoton MS :	180	500
• Superrezoluční MS: 4Pi	200	90
SIM:	100	250
STED, PALM, STORM:	20	50



Light Sheet Fluorescence Microscopy (LSFM)

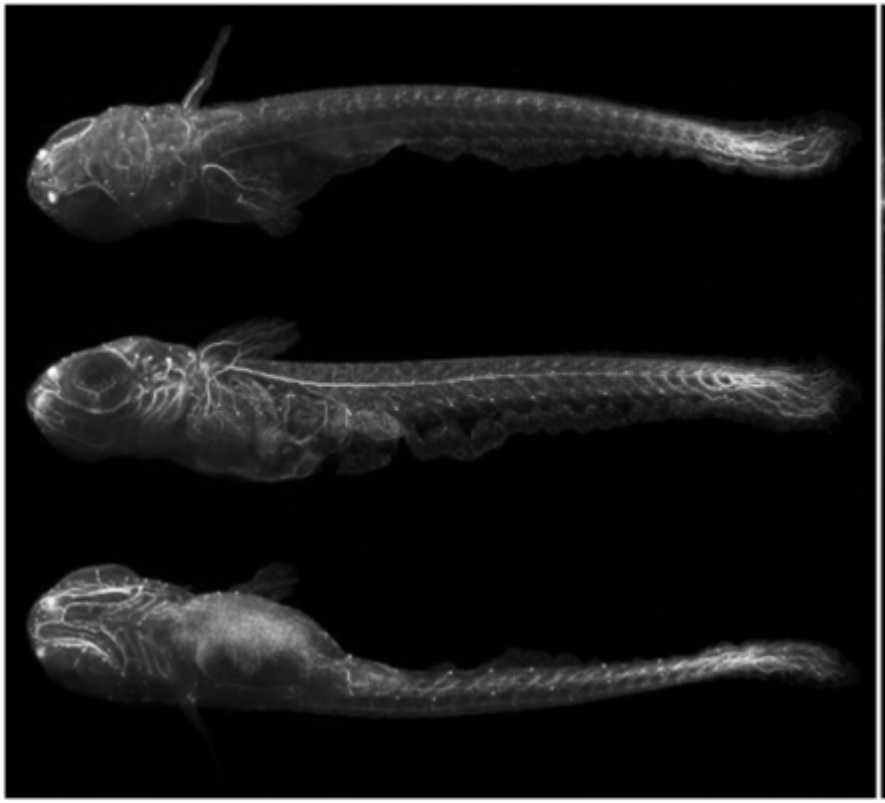
- zdroj světla je umístěn kolmo k optické dráze
- osvětlení vzorku pomocí úzké roviny světla (light sheet)
- nedochází k excitaci fluoroforů mimo rovinu světla = vhodné pro optické řezy



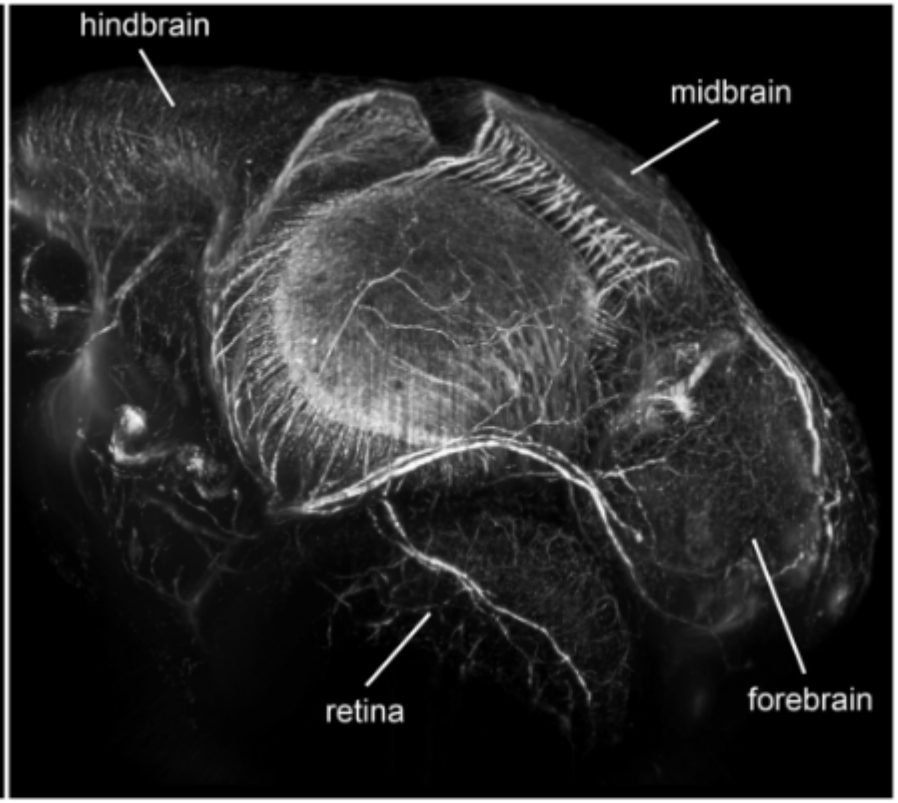


- vzorek uzavřen v agaróze, hydrogelu ve skleněné kapiláře (nedochází k deformacím objektu); posun objektu a otáčení → skládání 3D obrazu
- **výhodná zobrazovací metoda pro 3D zobrazování velkých objektů**

Light Sheet Fluorescence Microscopy (LSFM)



Medaka japonská – acetylovaný tubulin (zelená)

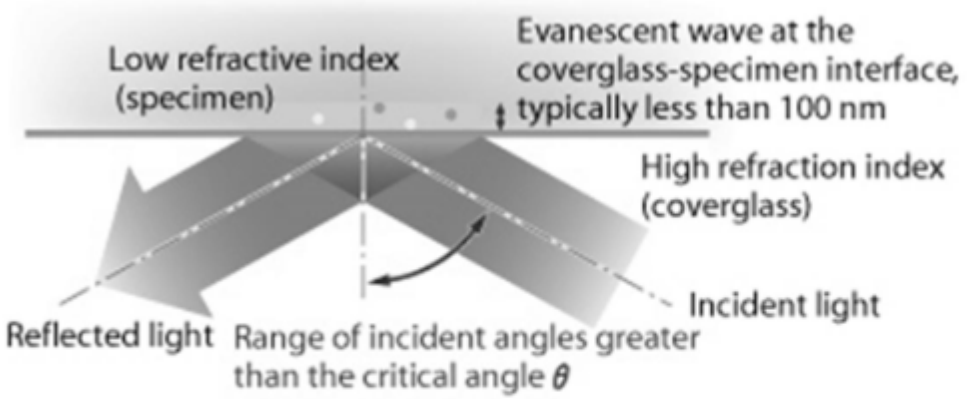


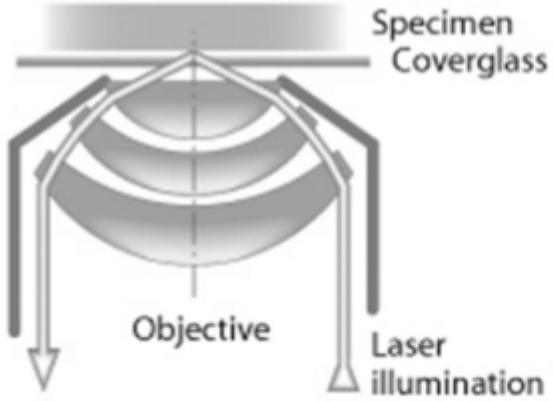
Hlava medaky – 20x zvětšeno

Total internal reflection fluorescence (TIRF)

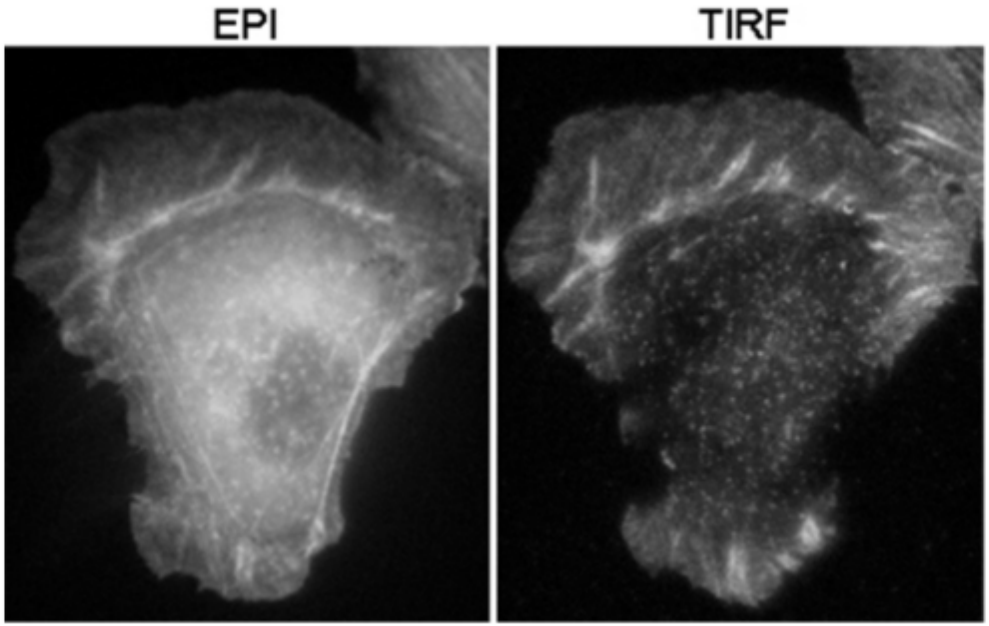
- **velmi vhodná metoda pro studium dějů na membráně**

- 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