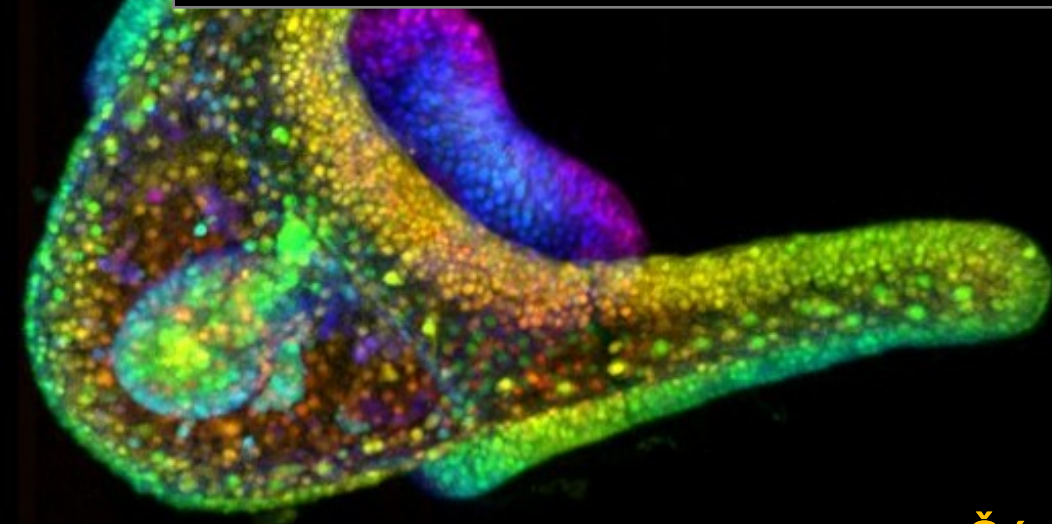


Fluorescence a Konfokální mikroskopie



Fluorescenční mikroskopie

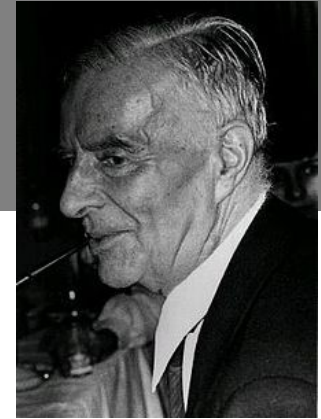
- Excitace a pozorování fluorescenčních molekul
- **Velmi často používaná:** vysoké rozlišení, citlivost, nízké pozadí, více kanálů...
- **Mnoho různých variací**
 - dekonvoluce, OMX (Structured Illumination Microscopy), deltaVision
 - konfokální, spinning disk, 2 foton
 - TIRF, FRAP, FRET, FLIM, iFRAP, FCS ...
 - PALM, STED, STORM, SIM, (super-resolution)
- **Stále ve vývoji**

K čemu je fluprescence dobrá?

Např.:

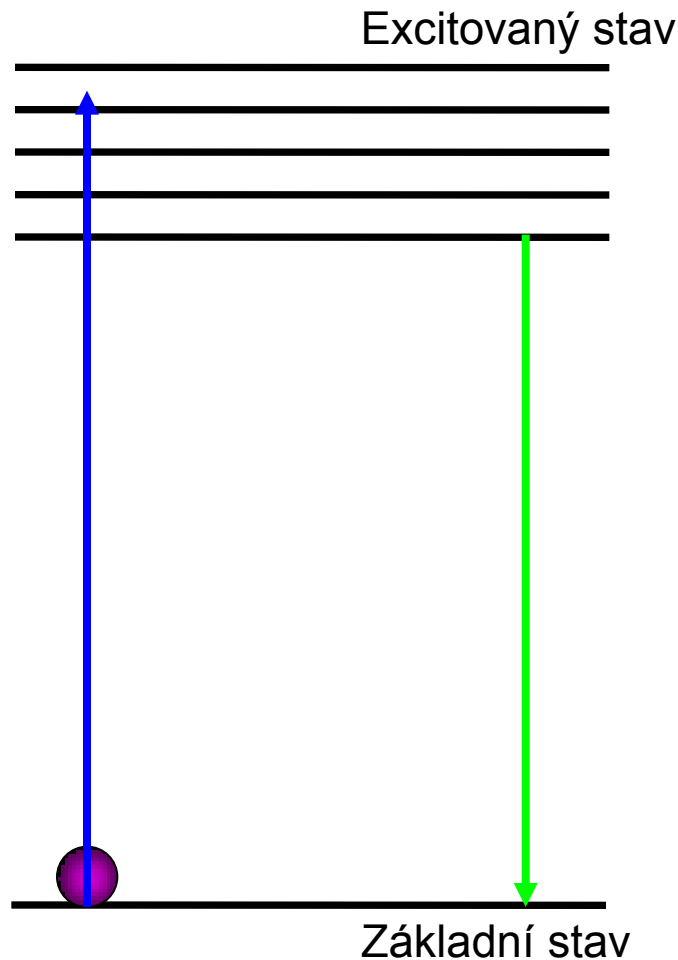
- Určení lokalizace specifických proteinů
- Určení tvaru orgánů, buněk, intracelulárních struktur
- Zkoumání dynamiky proteinů
- Studium interakce proteinů a proteinových konformací
- Zkoumání iontových koncentrací atd.

Fluorescence



- Jablonského diagram

- Aleksander Jabłoński (PL)



excitace

Kratší vlnová délka

Vyšší energie

emise

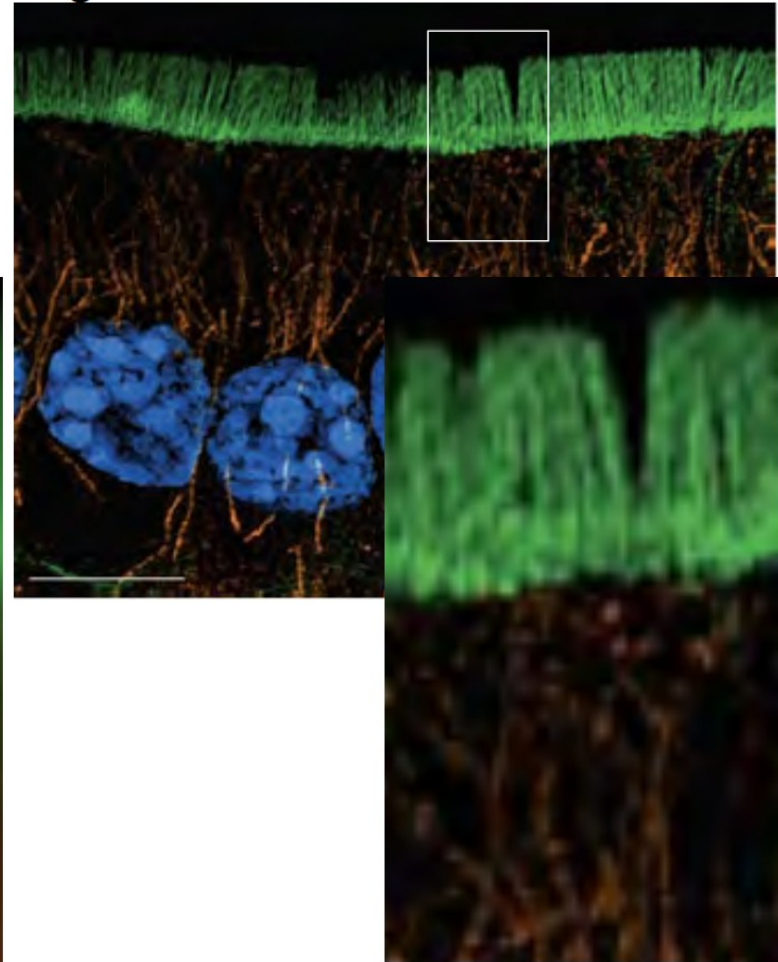
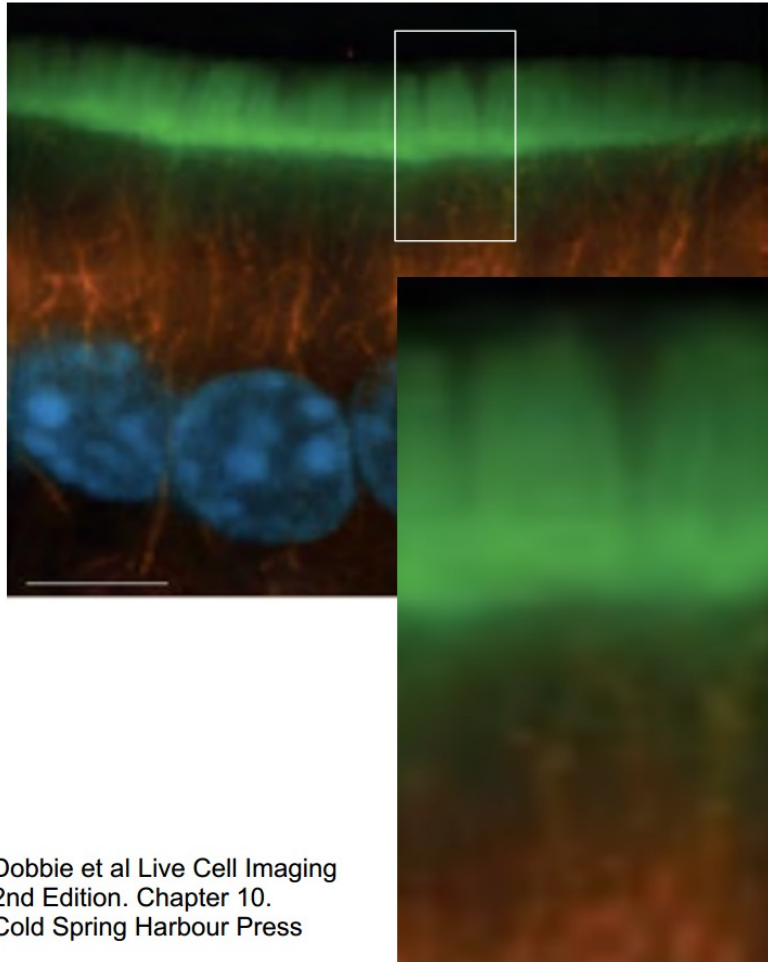
Delší vlnová délka,
méně energie

→ Stokesův posuv

Fluorescenční techniky

- Standartní techniky: wide-field
konfokál
2-photon
- Special techniky : FRET
FLIM
FRAP
Fotoaktivace
TIRF

Rozlišení



Dobbie et al Live Cell Imaging
2nd Edition. Chapter 10.
Cold Spring Harbour Press

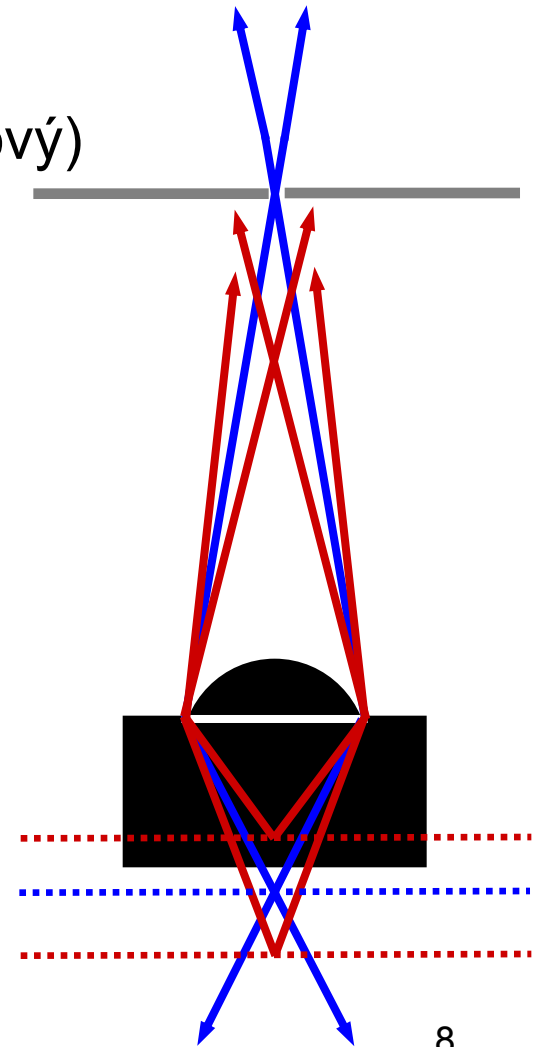
Konfokální mikroskop

- confocal laser scanning microscope (CLSM)
- Confocal - conjugate (sbíhat) + focal (ohniskový)

Termín "konfokální" znamená "mít stejné ohnisko/zaostření".

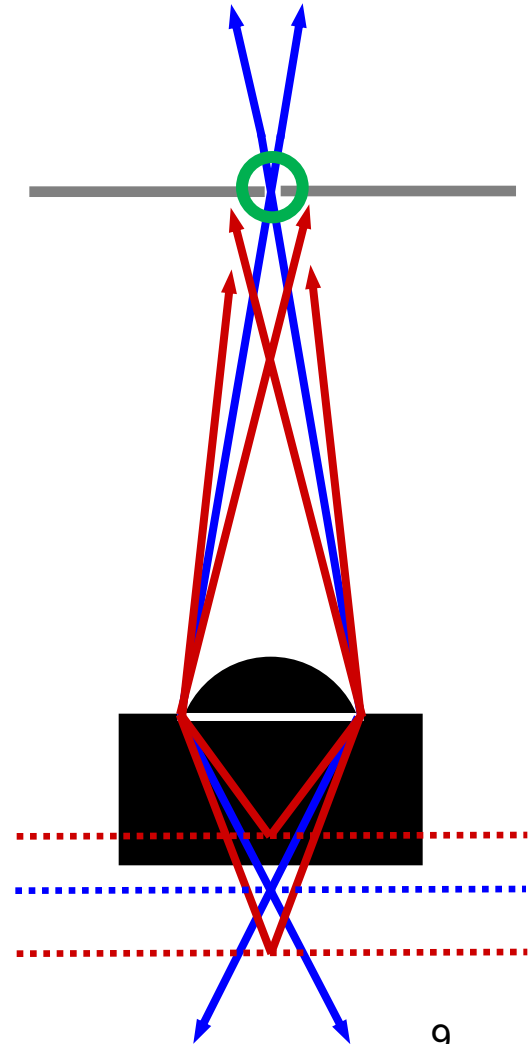
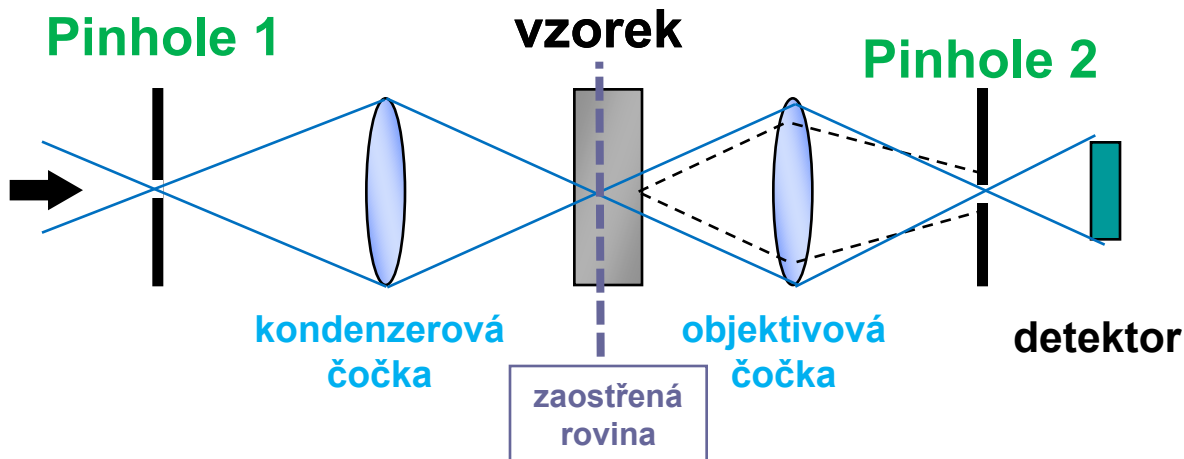
Toho je dosaženo tak, že se zaostří kondenzorové čočky do stejné ohniskové roviny jako čočky objektivu.

Konfokální mikroskop je druhem optického (fluorescenčního) mikroskopu, jehož výhodou je vyšší rozlišovací schopnost daná detekcí světla pouze z ohniskové roviny mikroskopu.



Konfokální mikroskop

- Na detektor dopadá pouze obraz řezu objektu v rovině fokusace (**modrá**)
- Odstranění „nezaostřené“ (**blurred**) části obrazu
 - a) opticky (**pinhole**)
 - b) výpočtem – dekonvoluce

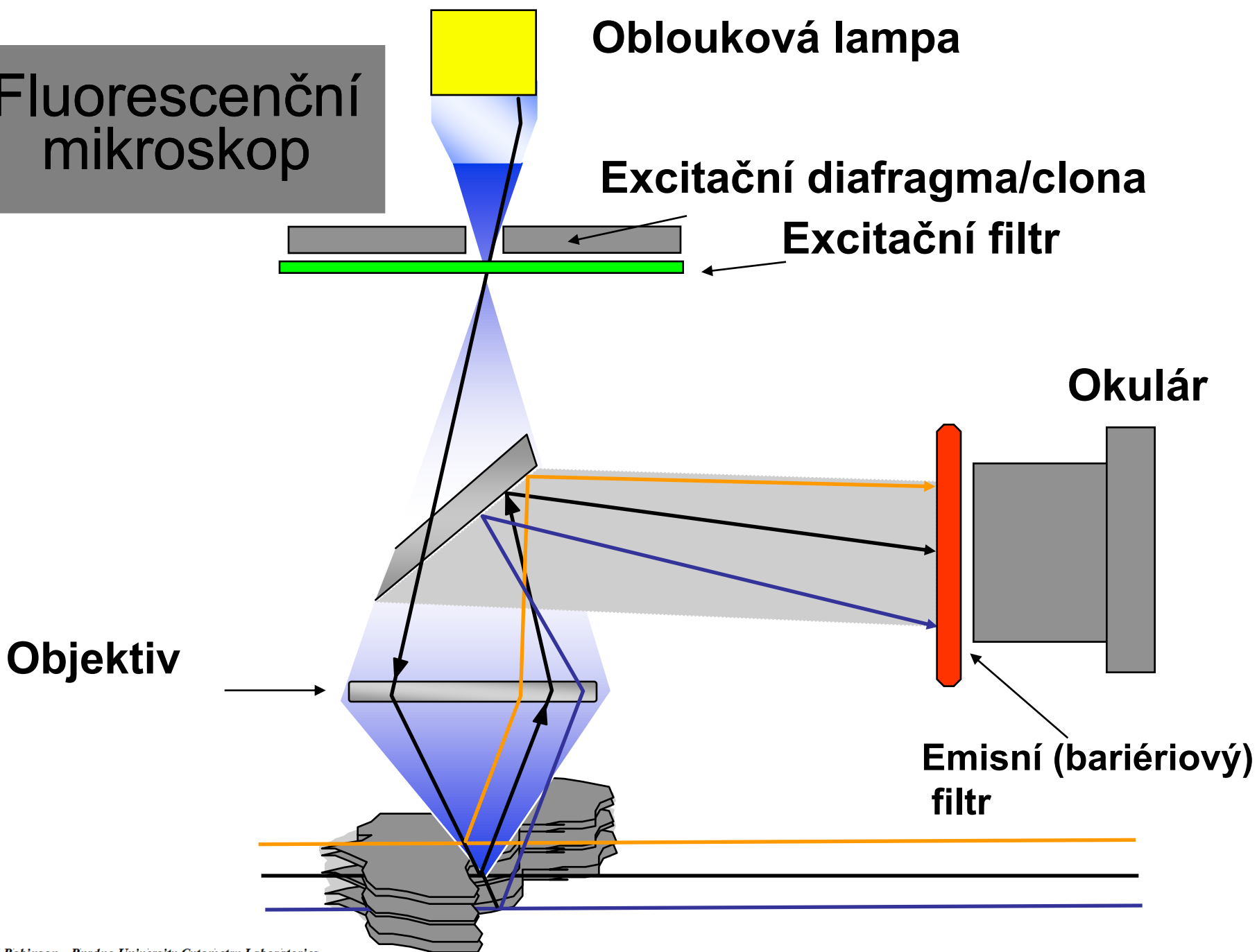




optický řez

- mšice

Fluorescenční mikroskop



Oblouková lampa

Excitační diafragma/clona

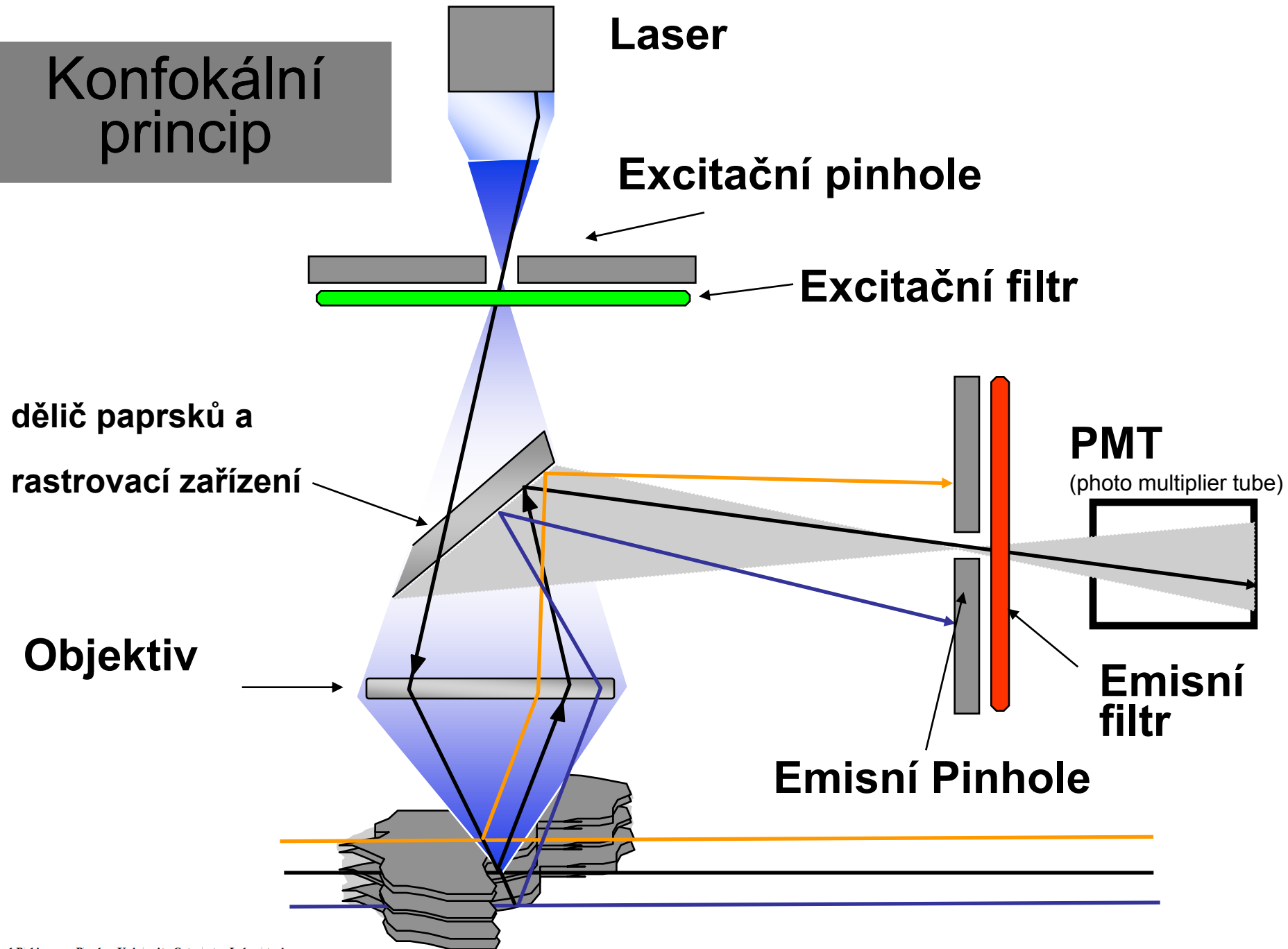
Excitační filtr

Okulár

Objektiv

Emisní (bariérový) filtr

Konfokální princip



Laser

Excitační pinhole

Excitační filtr

dělič paprsků a
rastrovací zařízení

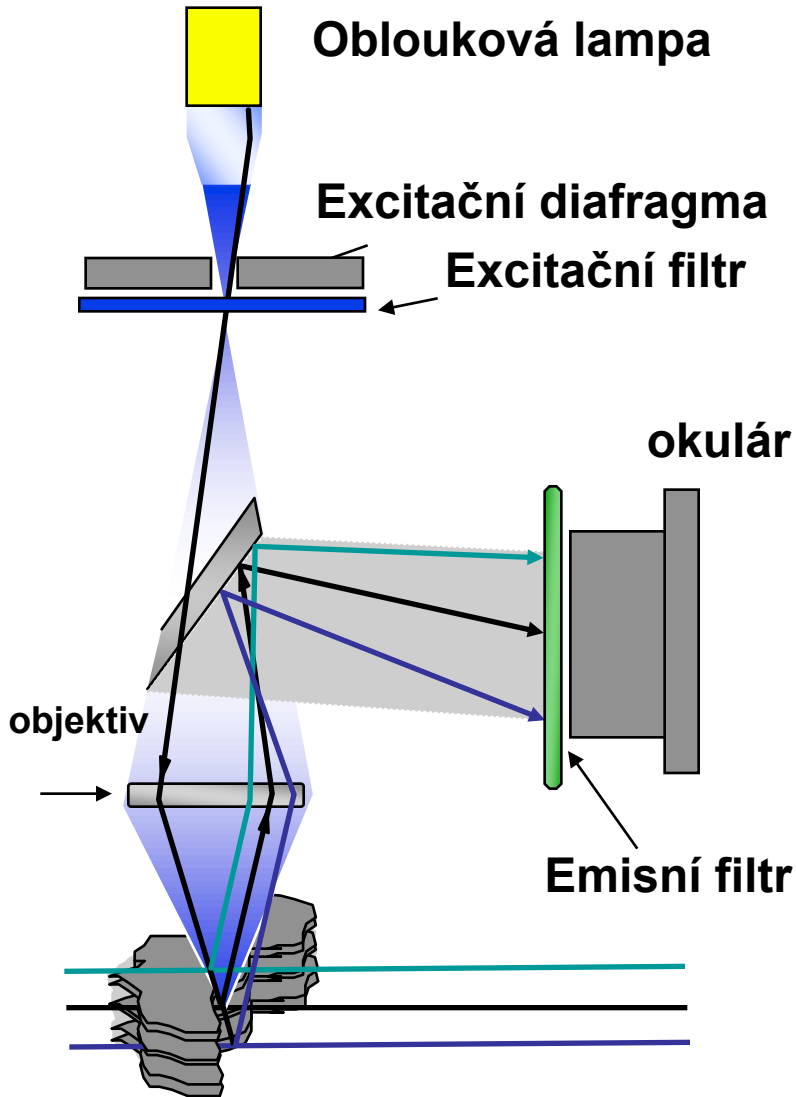
Objektiv

PMT
(photo multiplier tube)

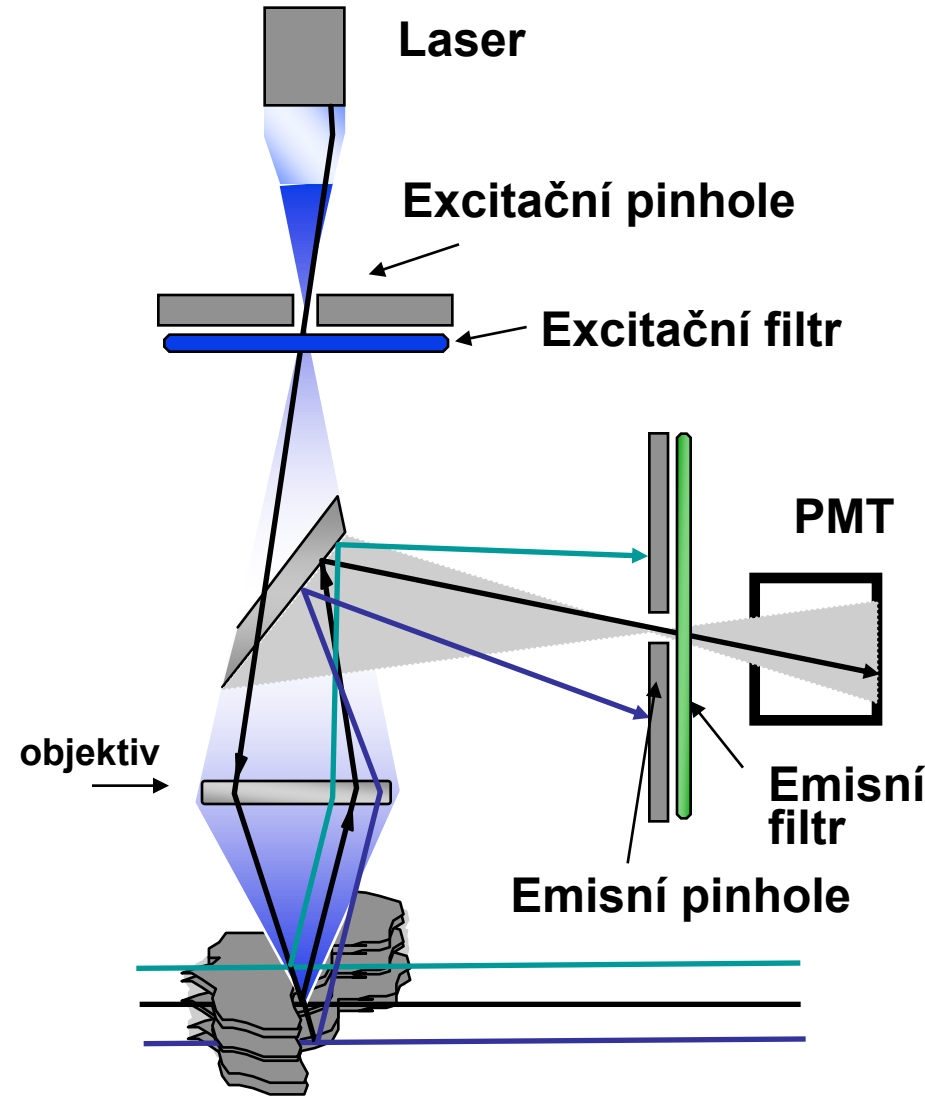
Emisní
filtr

Emisní Pinhole

Fluorescenční mikroskop



Konfokální mikroskop

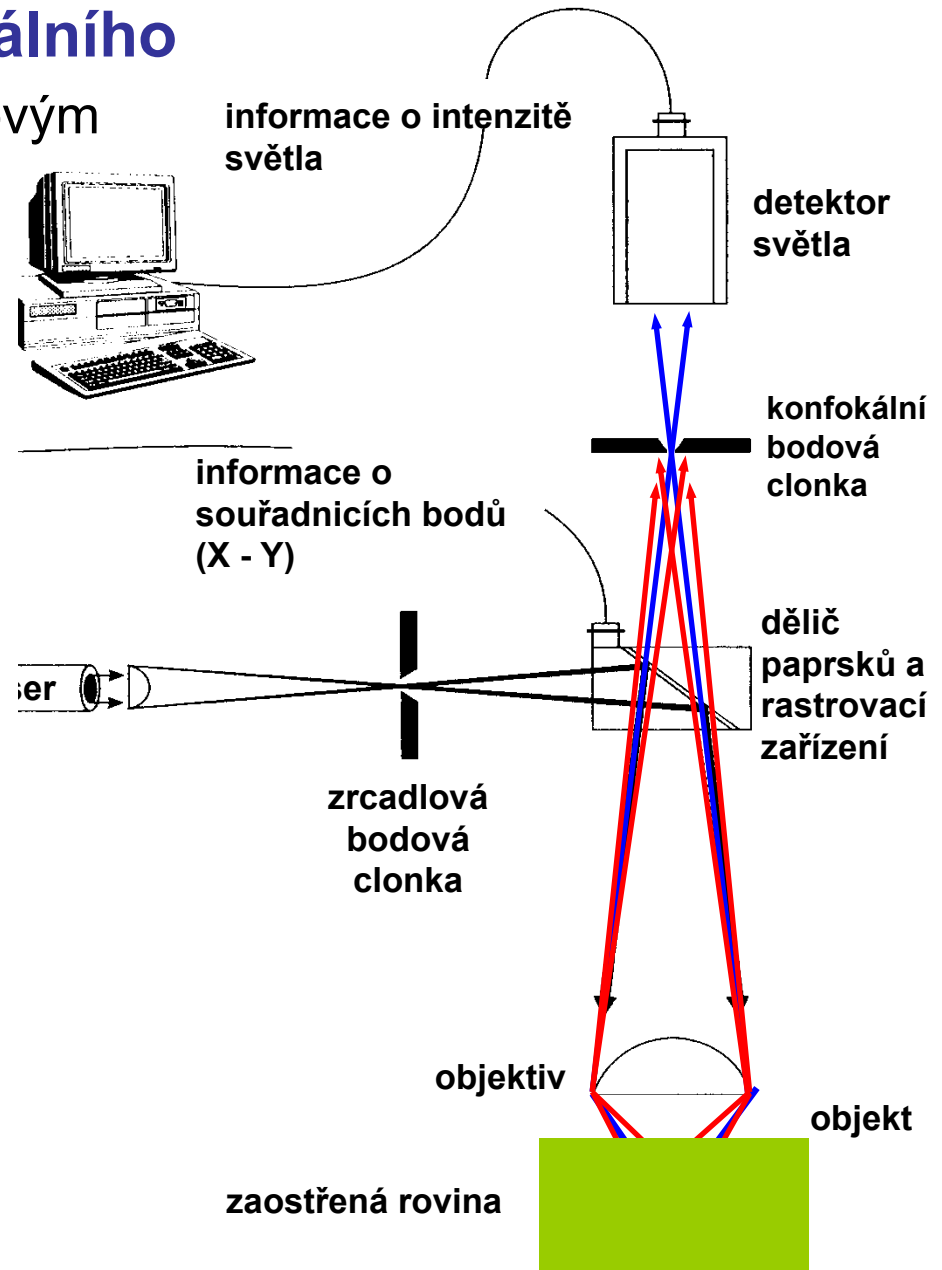


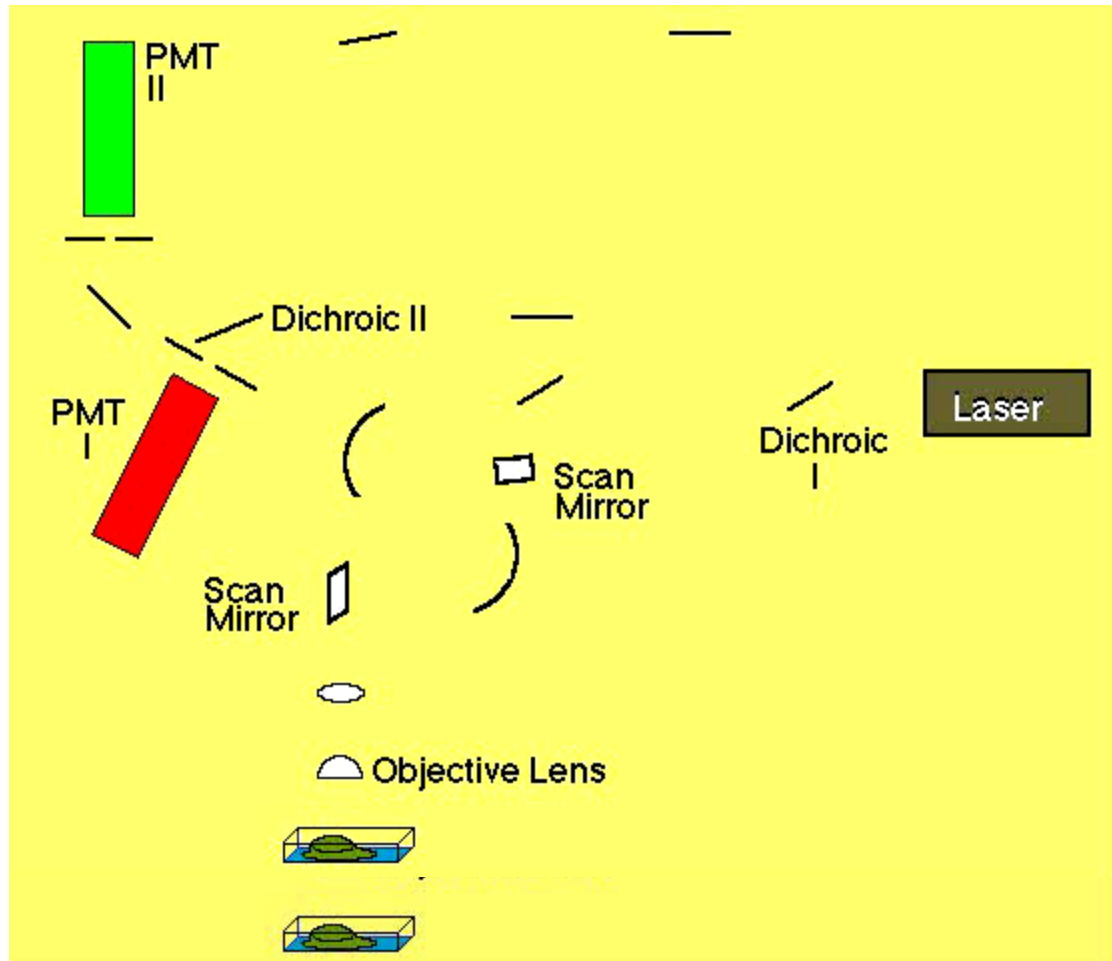
Výhody konfokální mikroskopie

- **Redukované rozostření** obrazu způsobené rozptylem světla
- Zvýšené efektivní **rozlišení**
- Lepší poměr **signálu** ku šumu
- Jasně / „čisté“ pozorování **tlustých vzorků**
- Možnost skenování v ose Z
- Vnímání hloubky obrazu a prostorového uspořádání v řezech v ose Z

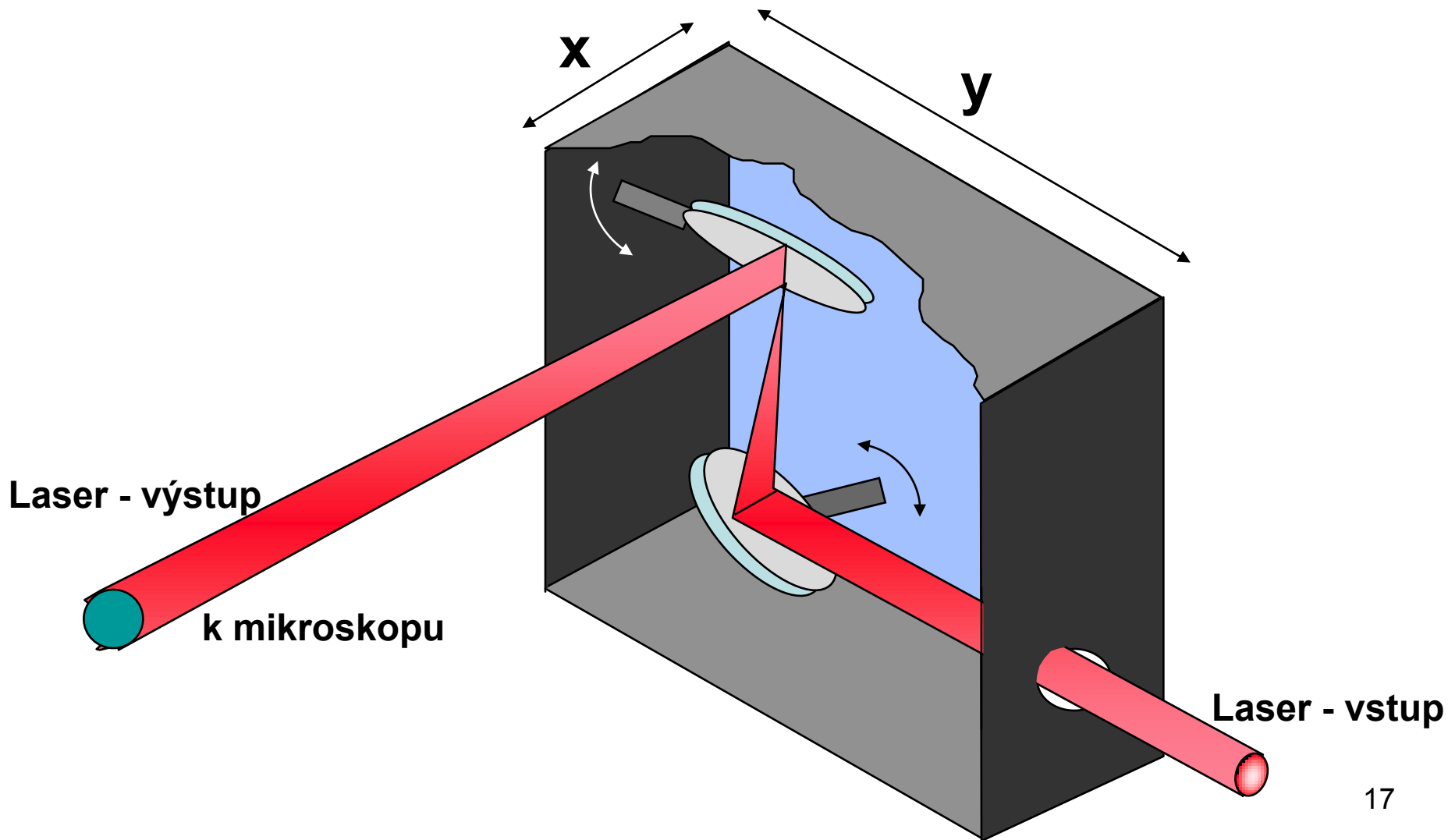
Schéma současného konfokálního mikroskopu (s rozmítaným laserovým paprskem)

- Bodový zdroj světla: laserový paprsek fokusovaný na clonu
- Clona je objektivem zobrazena do bodu (průměr = rozlišovací schopnosti objektivu)
- Objektiv sbírá světlo odražené a rozptýlené – zpětný průchod objektivem: obraz bodové clonky
- Druhá konfokální bodová clonka (blokuje nezaostřené roviny)
- Fotonásobič a detektor světla

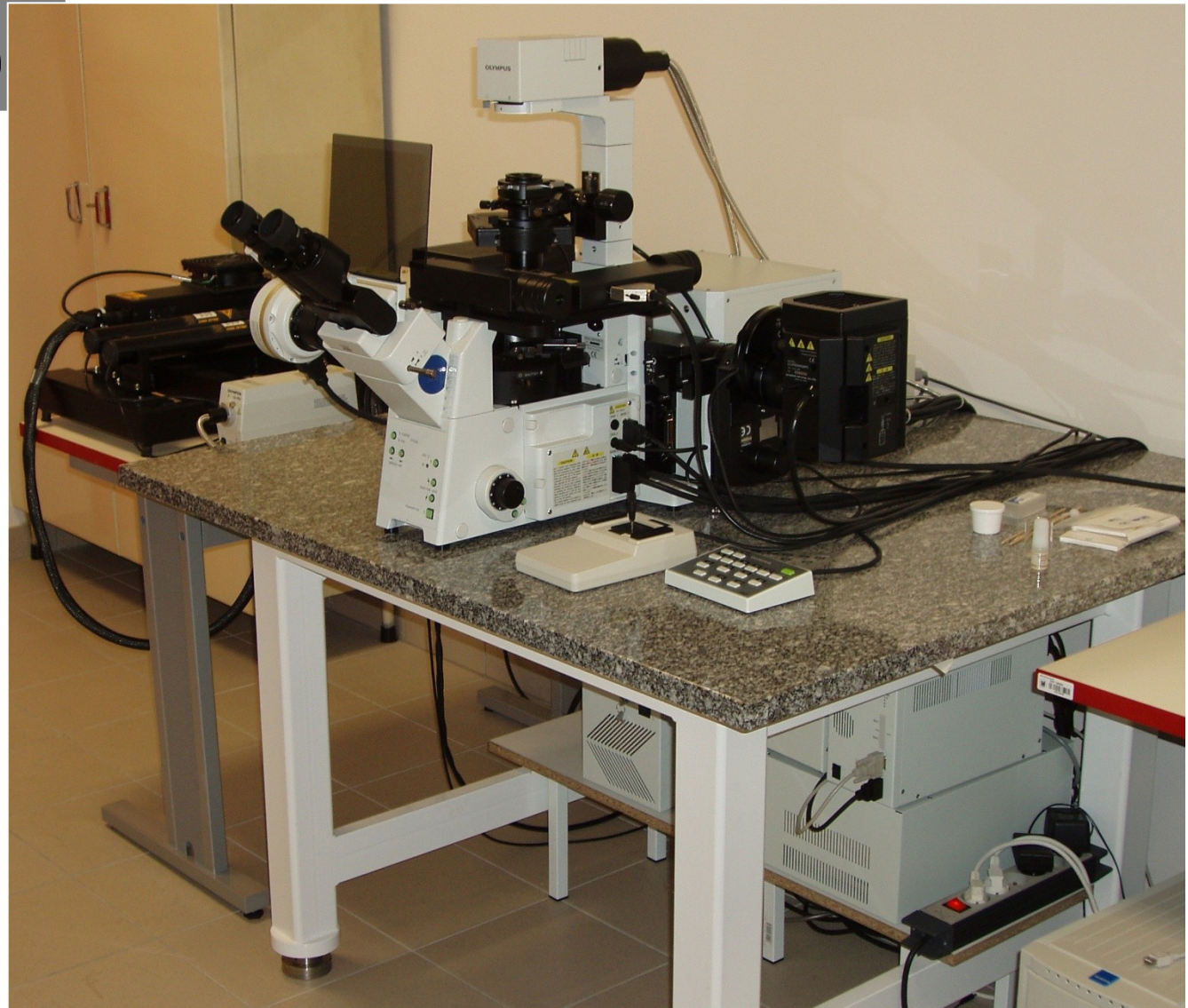




Bodové skenování



Olympus Fluoview 500



- a** mikroskop IX 81
- b** konfokální nástavec
- c** lasery
- d** řídicí jednotky

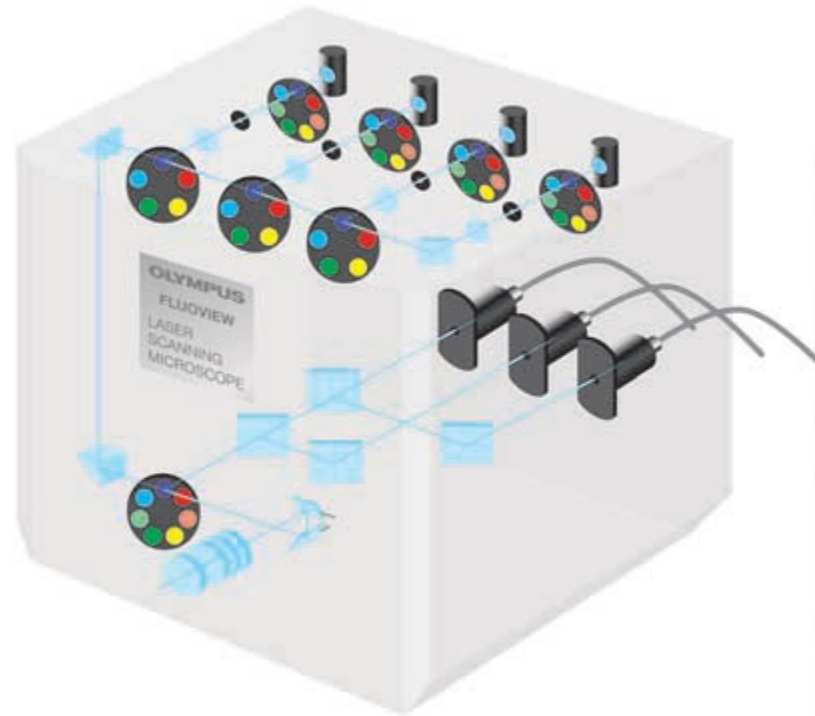
Olympus Fluoview 500

- optické řezy v rovinách XY, XZ, XYZ , XZY
- schopnost zaznamenat změny i v časové rovině XYt, XYZt
- současné snímání obrazu v procházejícím a fluorescenčním světle
- použití 4 kanálů zároveň
- sekvenční snímání
- volitelnost rychlosti a typu rastrování => kvalita snímku
- kompenzace šumu, zesílení signálu
- 3D rekonstrukce obrazu a rotace - Imaris

Skenování – str. 7, 3D imaging str. 8:

<http://www.olympusfluoview.com/brochures/pdfs/fluoview.pdf>

Olympus Fluoview 500



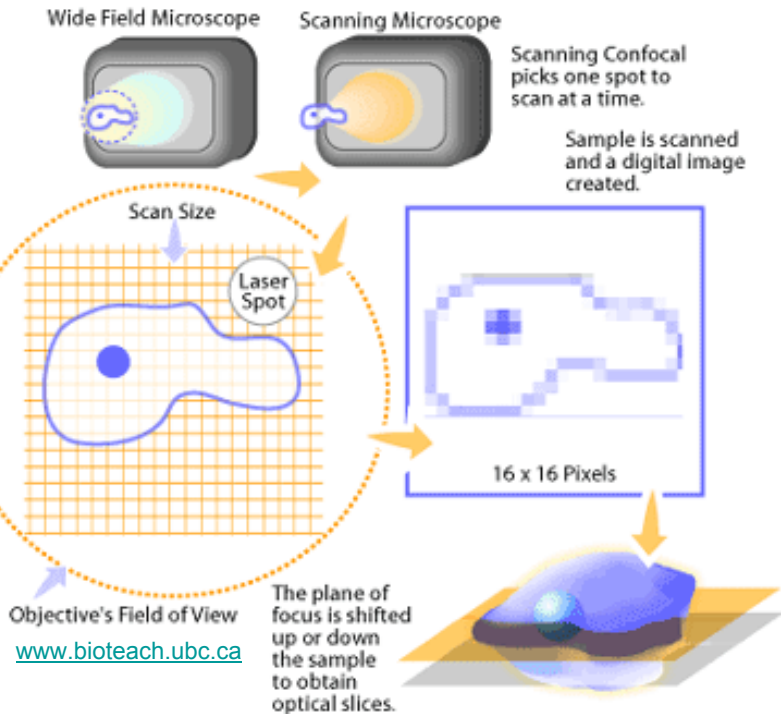
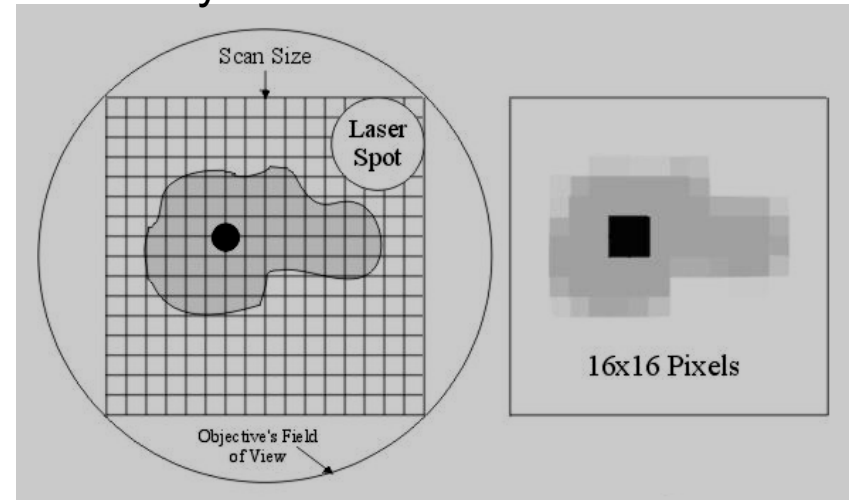
Stavba – str. 4:

<http://www.olympusfluoview.com/brochures/pdfs/fluoview.pdf>

Rastrování

typy mikroskopu:

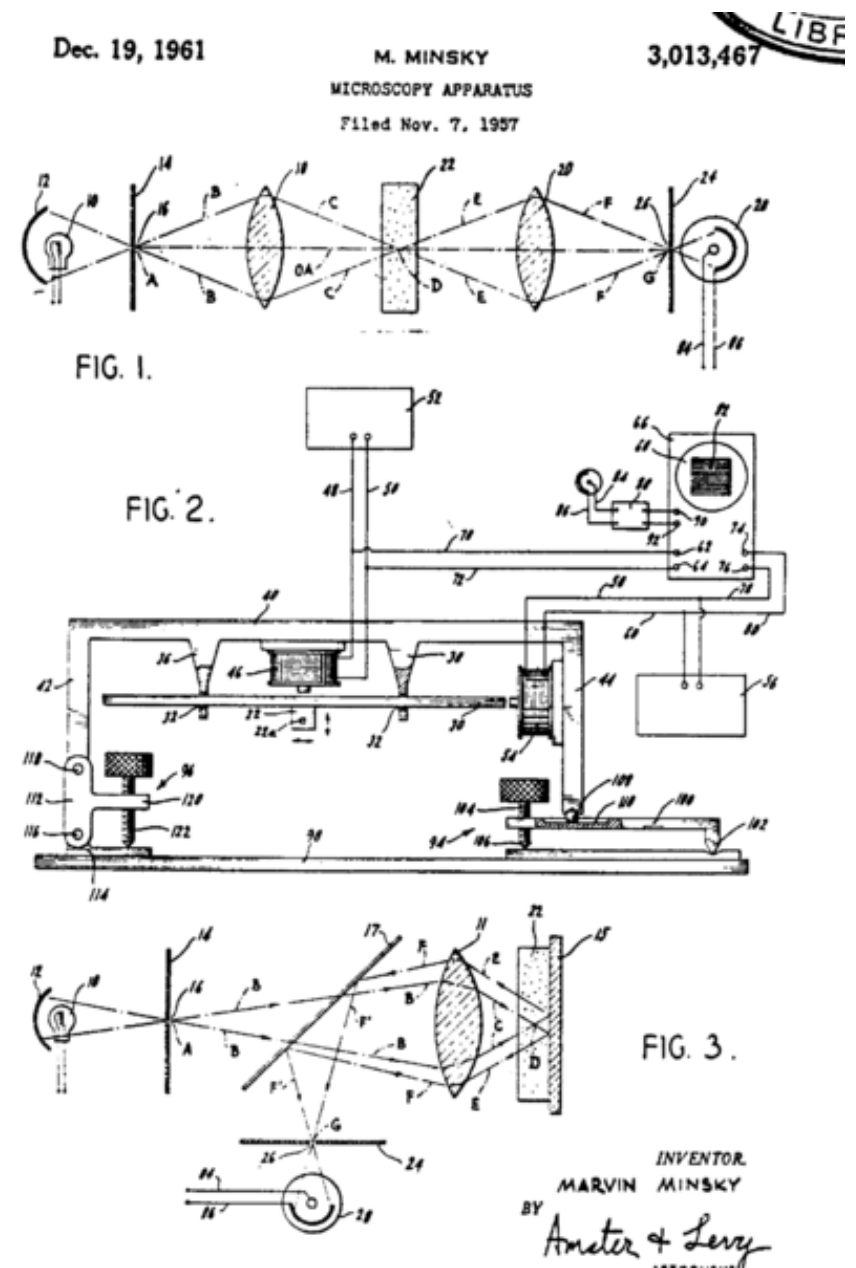
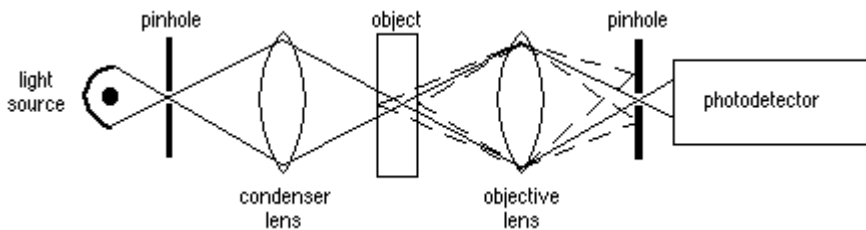
- rastrující konfokální mikroskop - skenující zařízení zařizuje posun ohniska excitujícího laserového paprsku
- konfokální mikroskop s rotujícím diskem - místo skenujícího zařízení obsahuje rotující Nipkowův kotouč, na kterém je mnoho navzájem oddělených clonek



- netvoří obraz vcelku, ale bod po bodu, řádkováním
- pomocí řádkování jsou snímány optické body v rovině XY i jednotlivé optické řezy v ose Z díky definovanému posuvu objektivu
- konfokální obrazy jsou zaostřené a představují jednotlivé optické řezy vzorkem
- složení trojrozměrných obrazů vychází z možnosti postupného snímání desítek až stovek optických řezů v ose Z

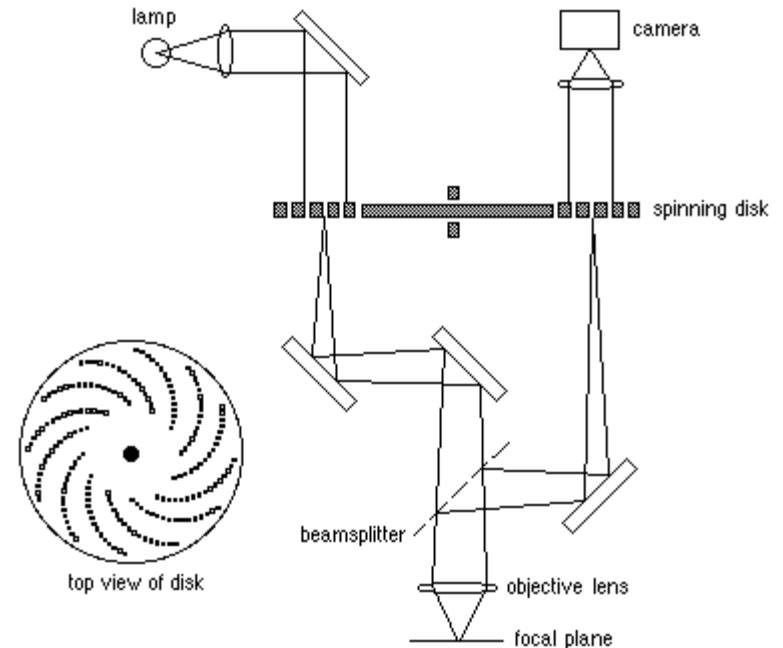
Historie

- Marvin Minský
- 1957 – patent
- neměl vhodný zdroj světla



Historie

- **Petráň M. a Hadravský M.** (1967) - konstrukce konfokálního mikroskopu pracujícího na bázi rotace Nipkowova kotouče (*Tandem Scanning Confocal Microscope*)
- rozvoj od konce 70. let 20. století
 - rozmítaný laserový paprsek, počítač
- dvou (multi-) fotonový mikroskop

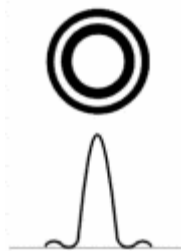


<http://www.currentprotocols.com/protocol/cy0208>

Doporučuji dokument čt: Prof. Petráň (cca 18 min):
<http://www.ceskatelevize.cz/program/10209988352-07.05.2009-22:45-2-zaslapane-projekty.html?backaddr=search&tipy=1&online=1>

Klasická mik.

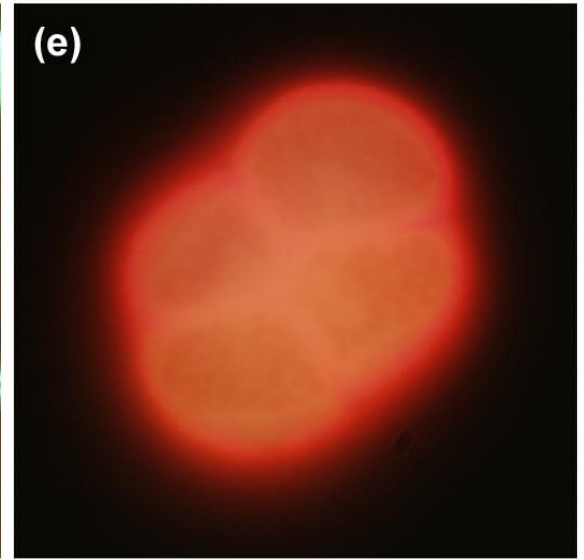
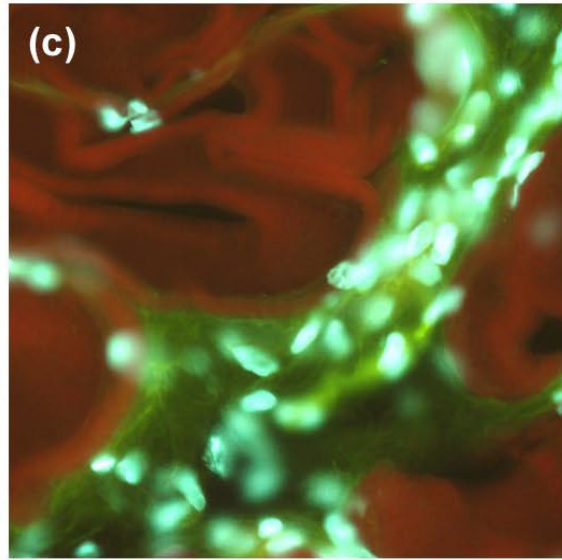
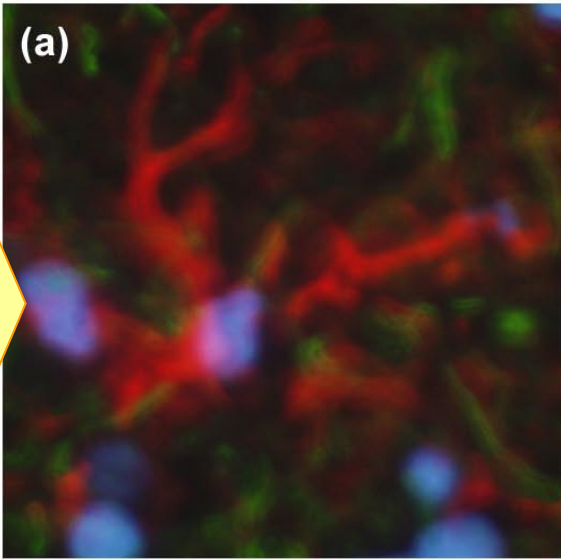
- Předpoklad malé tloušťky preparátu
- Silné vzorky – překrývání obrazu zaostřené roviny nezaostřenými (nad i pod)
- Vzorky o tloušťce menší než je hloubka ostrosti objektivu (závisí na numerické apertuře)
- obrazem ne bod, ale Airyho kroužky



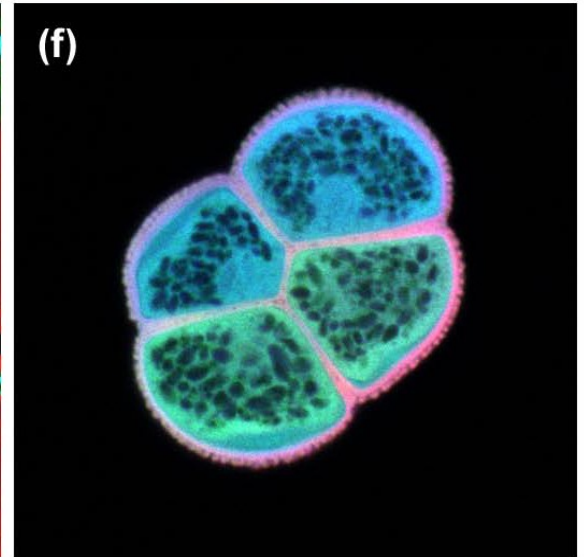
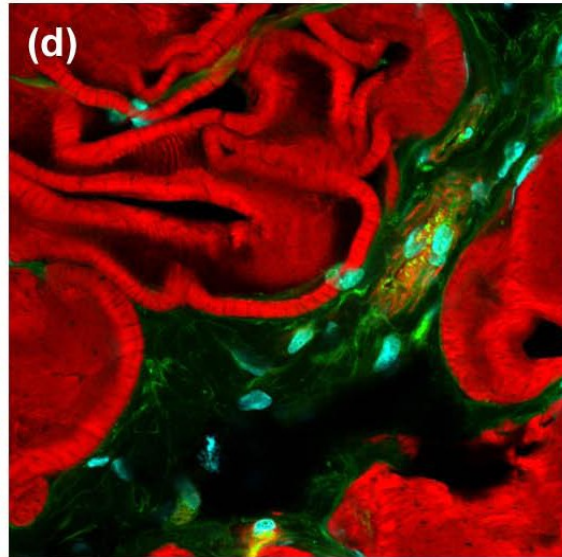
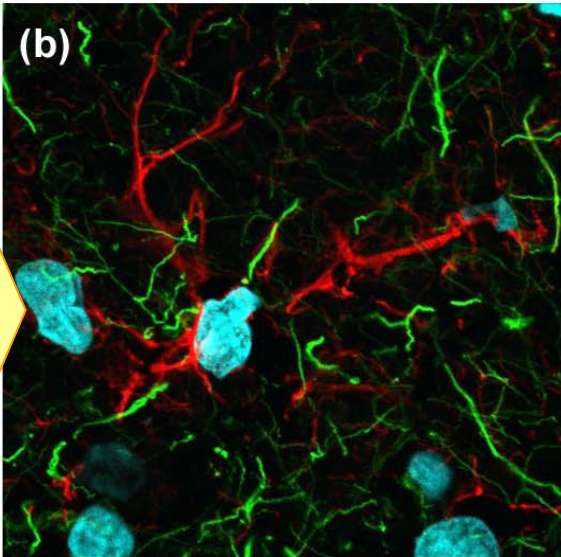
Konfok. Mik.

- Potlačení mlhavého pozadí obrazu
- Optická tomografie
- Obraz vzniká skládáním z jednotlivých bodů, které jsou pozorovány přes clonky, jejíž rozměry bývají menší než Airyho kroužky

widefield



CLSM



myší mozek
hippocampus

myší hladká svovina

pylové zrno, slunečnice

Poznámka: významné množství fluorescenčního signálu obrazu v širokém poli se nachází mimo ohniskové roviny.

Výhody CLSM



- odstranění mimoohniskových rovin
- vysoký kontrast obrazu
- neinvazní metoda
- zachování prostorového uspořádání
- schopnost vytvoření prostorové rekonstrukce
- digitální forma výstupu - rotace, perspektiva, ...
- schopnost zobrazení buňky - tkáně - mnohobuněčného organismu
- současné použití až 4 kanálů + procházející světlo

Nevýhody CLSM

- délka zpracování materiálu i snímků → „vyhasínání fluorescence“ (photobleaching)
- neostré snímky při nízké intenzitě fluorescence
- pořizovací cena (mikroskop, konfokální nástavec, počítač + program)

Photobleaching Rates in Multiply Stained Specimens

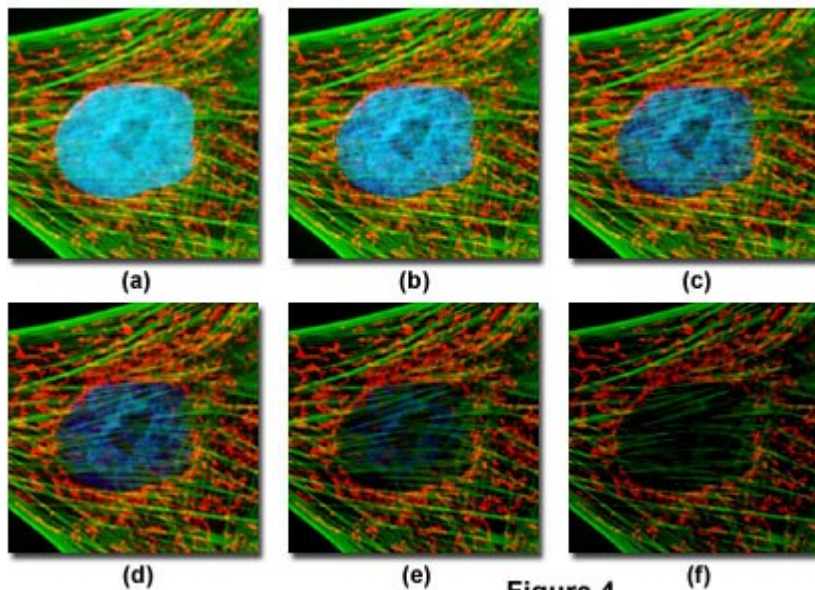


Figure 4

Differential Photobleaching in Multiply-Stained Tissues

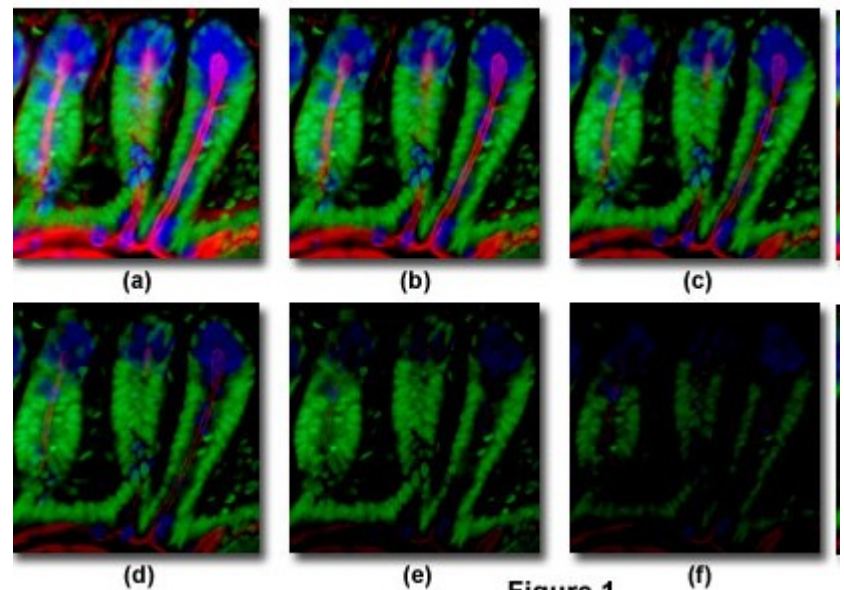
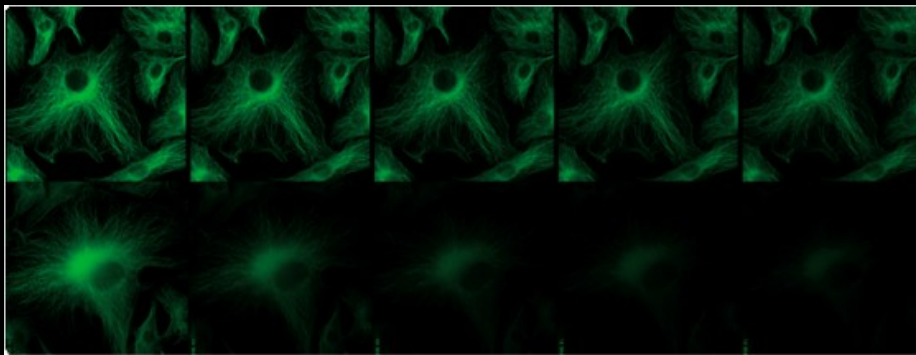


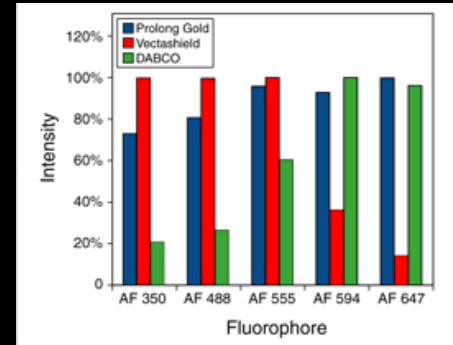
Figure 1

Before bleaching

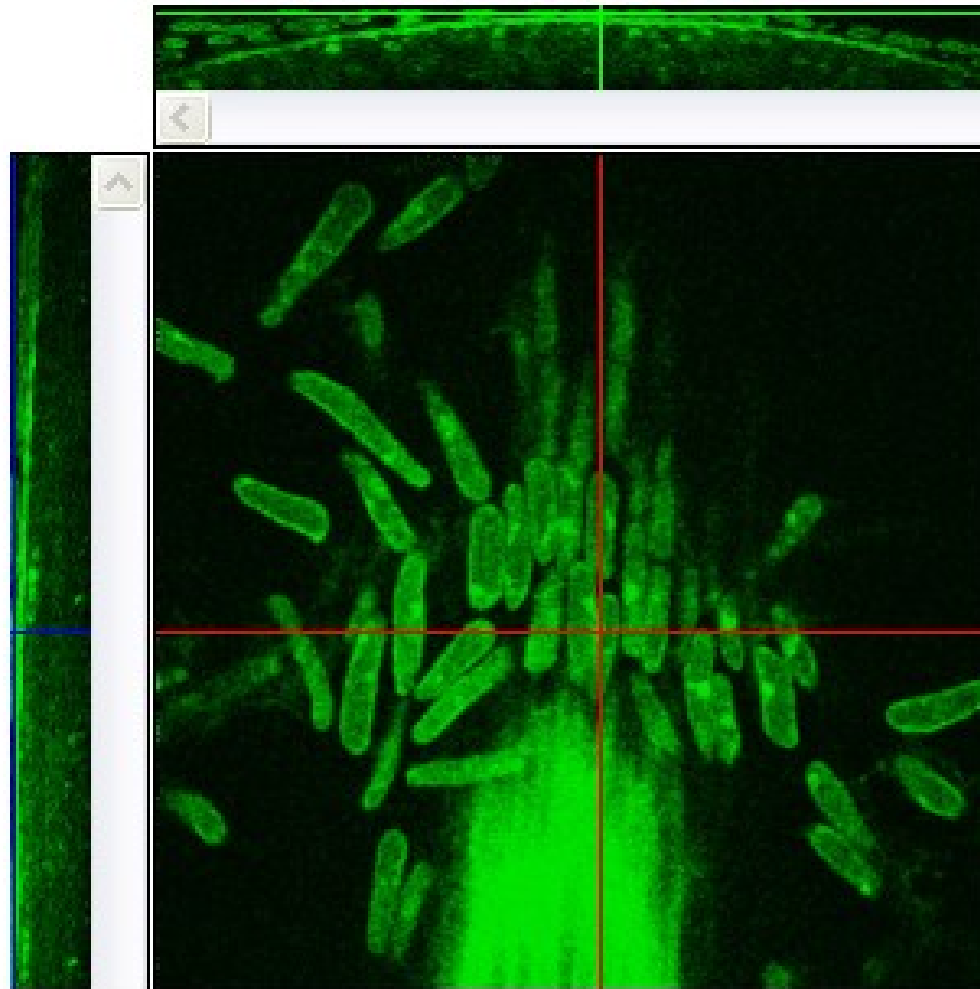
After bleaching



← ProLong® Gold antifade reagent



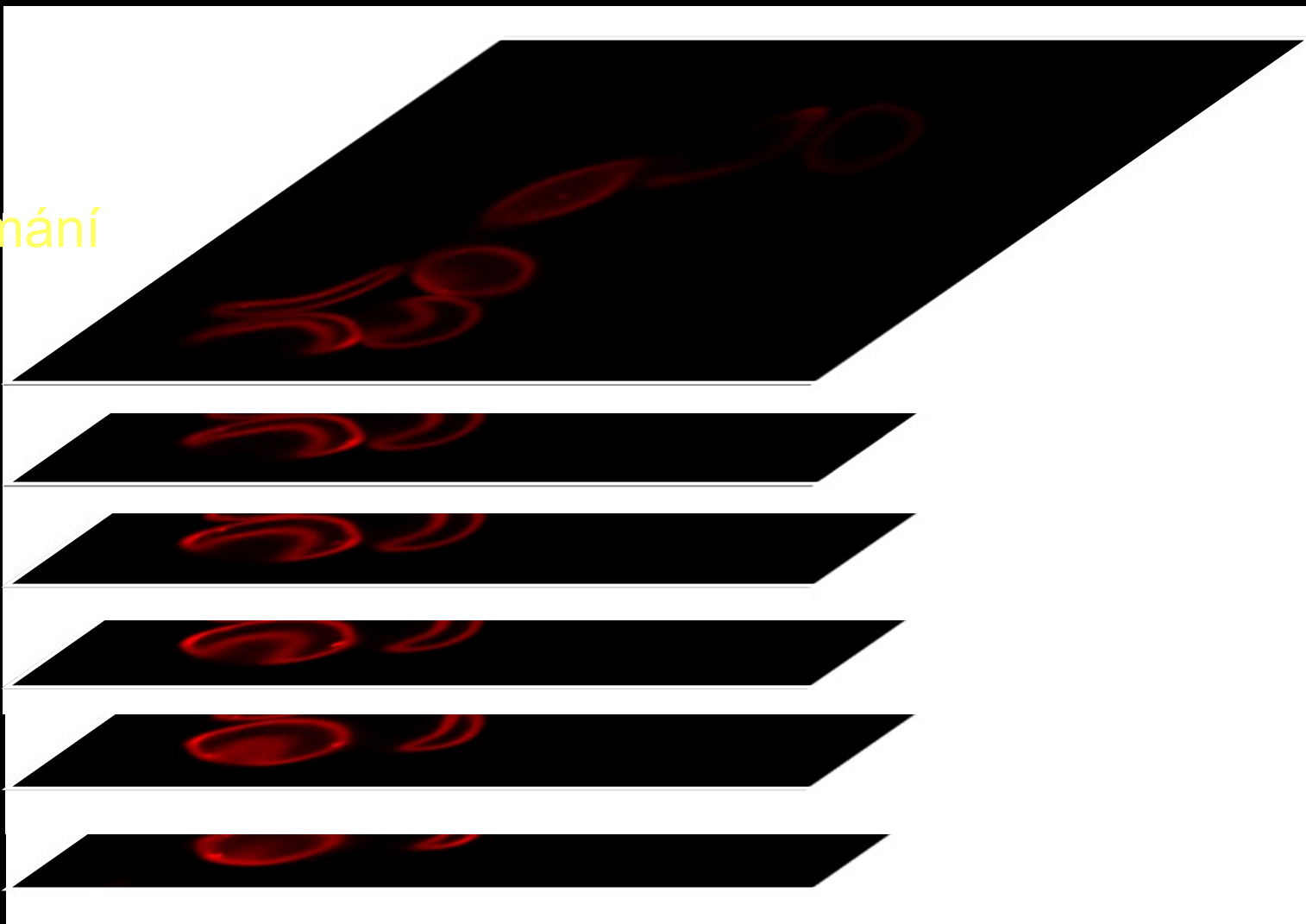
- Prolong Gold
- Vectashield
- DABCO

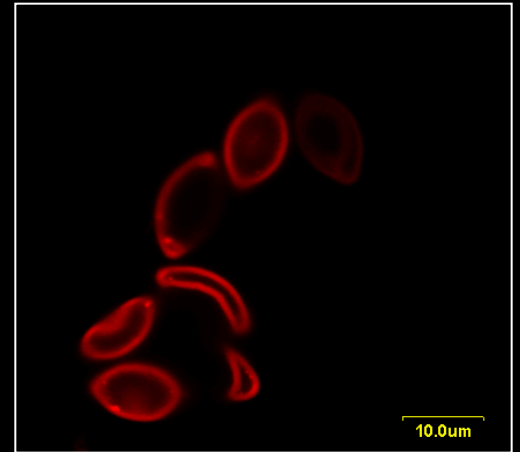
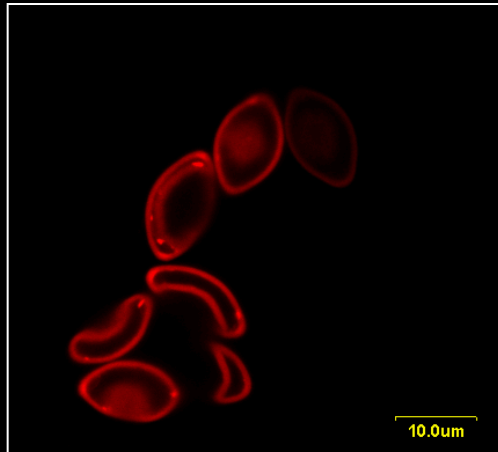
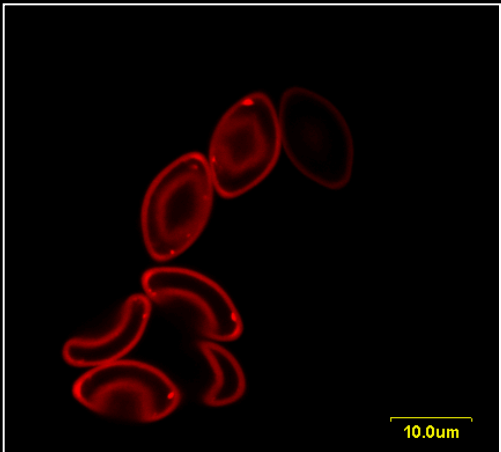
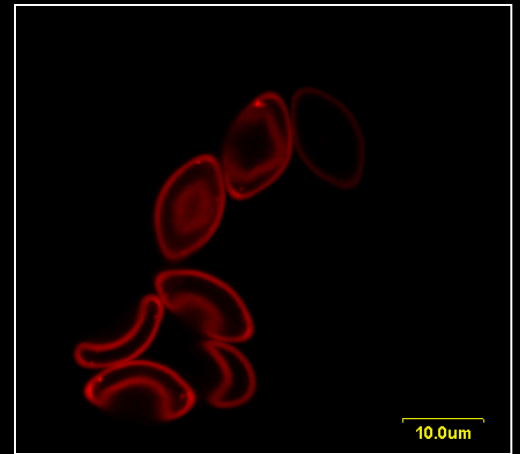
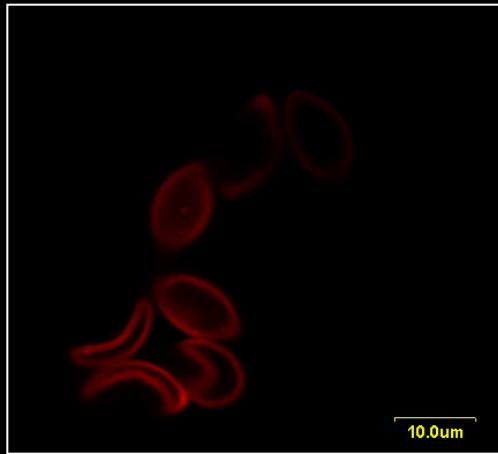
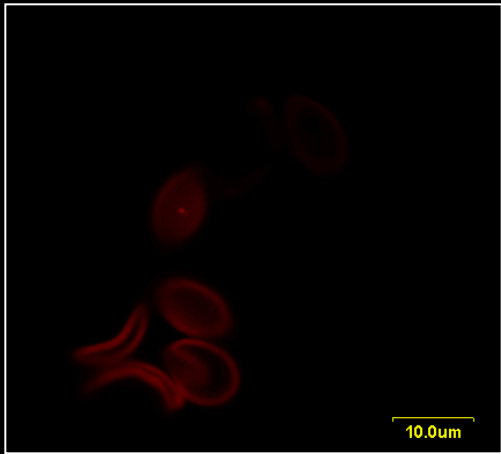


XZ slice
along this line

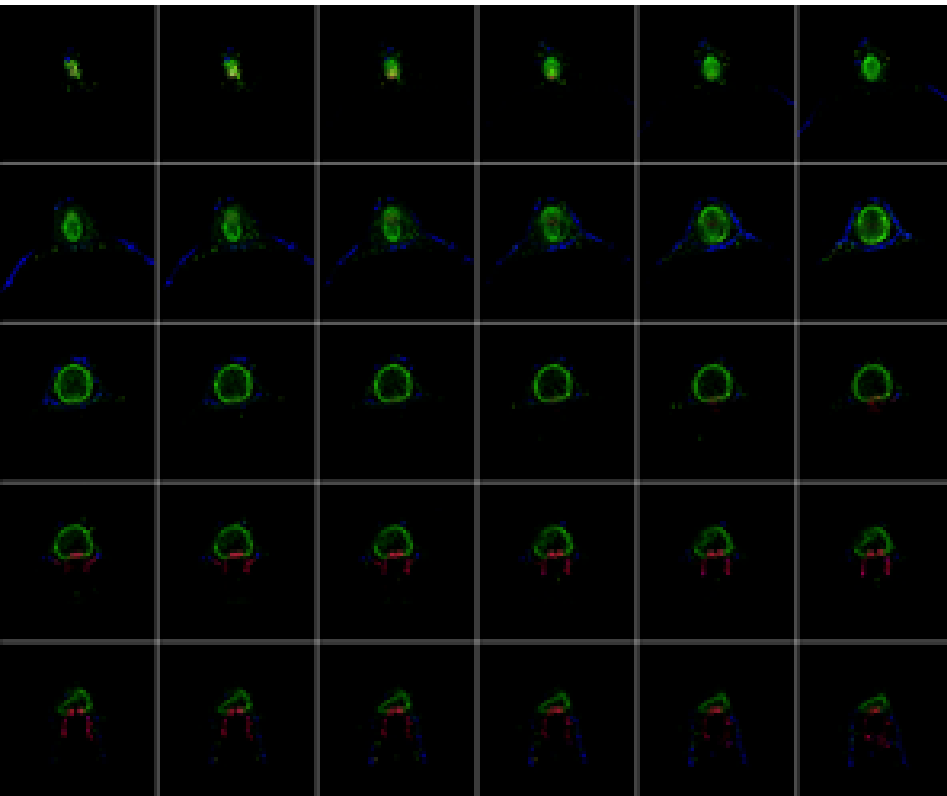
YZ slice
along this line

směr snímání

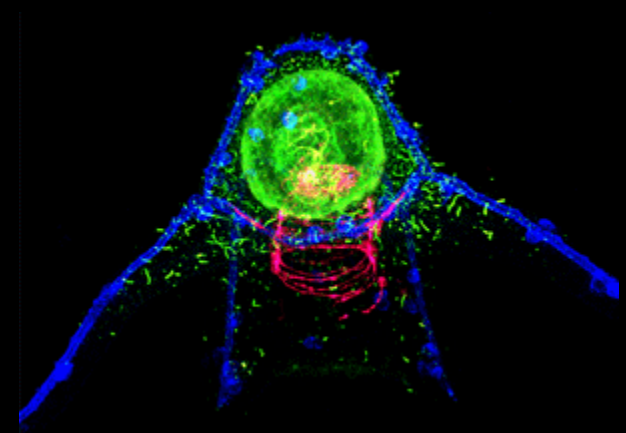
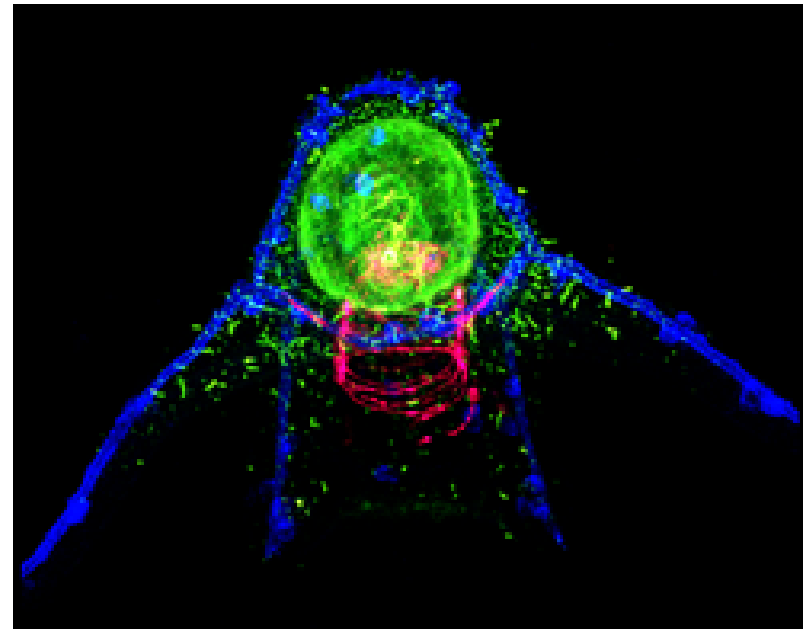




Gallery view of 3 color Z-stack

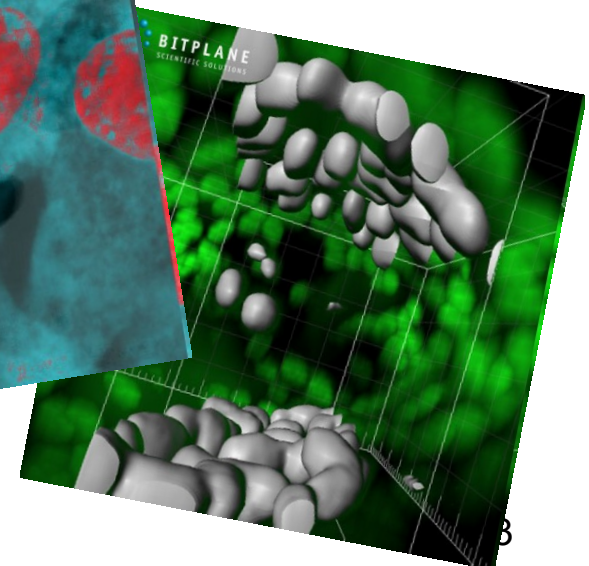
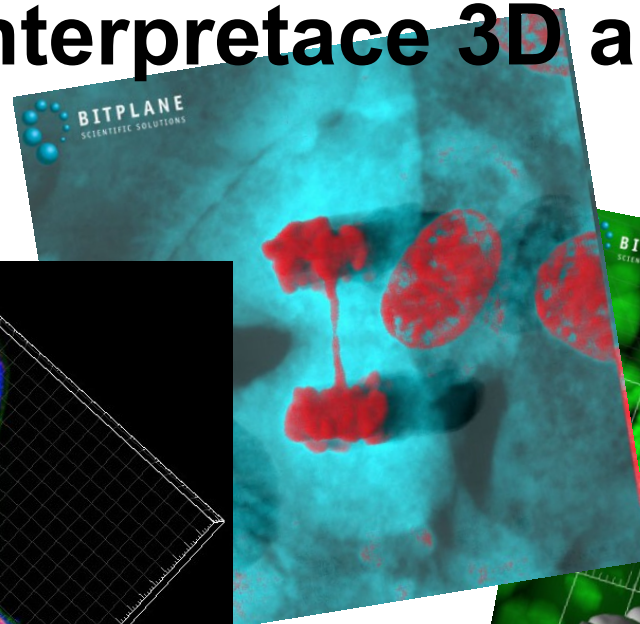
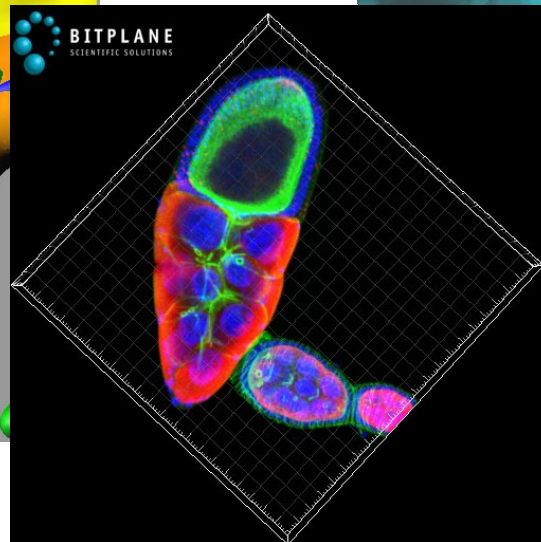
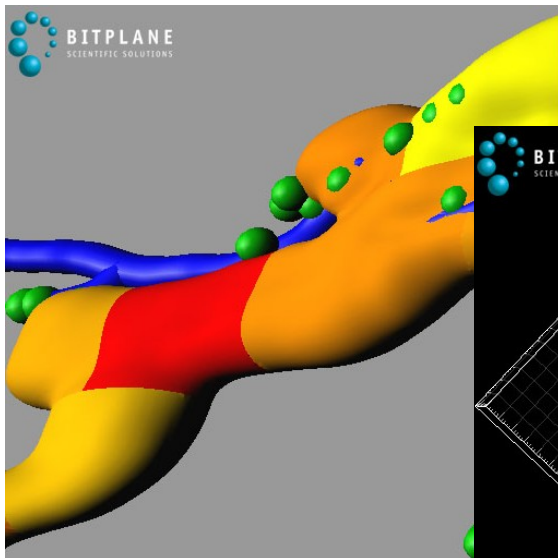
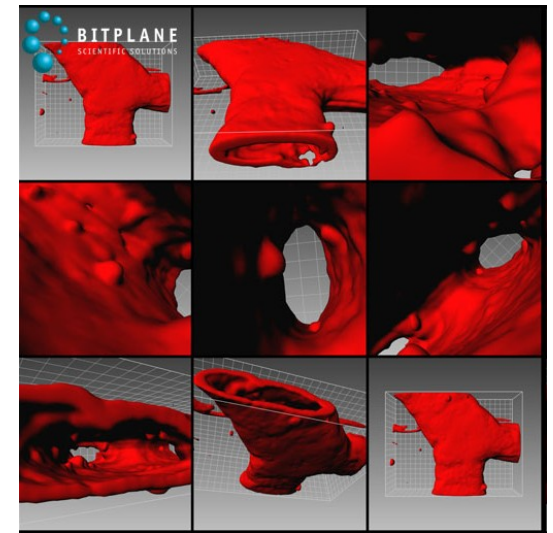


Maximum Intensity Projection



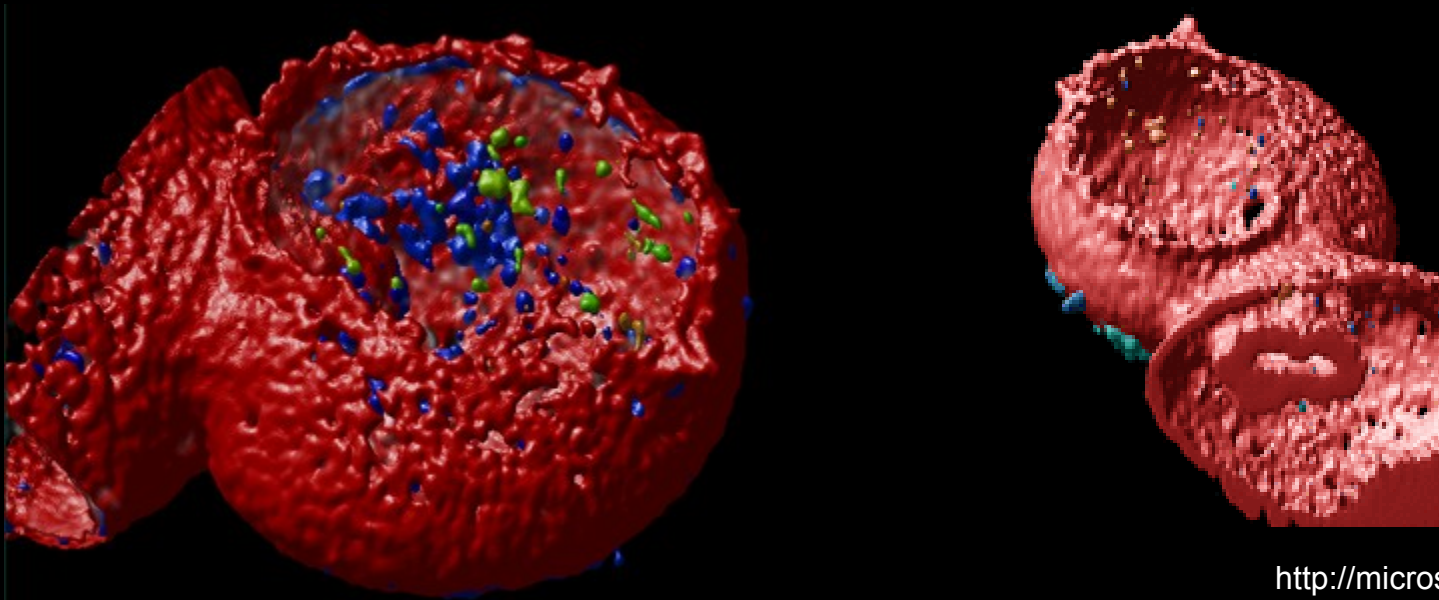
Imaris

- software (Bitplane)
- **vizualizace**
- **segmentace a interpretace 3D a 4D dat**

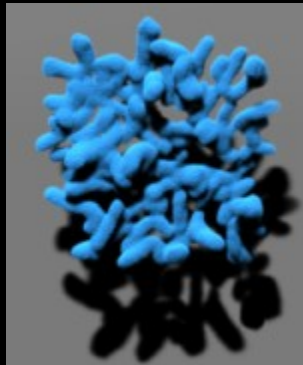


Další programy:

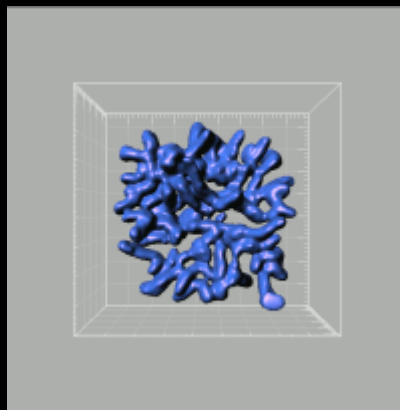
Leica LAS software, ImageJ, MetaMorph and Huygens



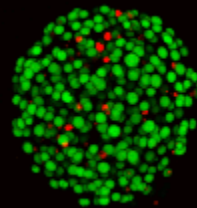
<http://microscopy.duke.edu/3D/>



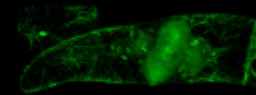
Metaphase :
LSM510 3D
module (Zeiss)



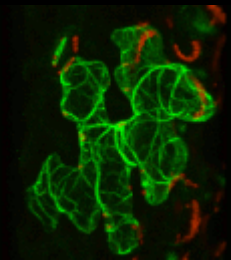
Metaphase
Imaris software Bitplane



neurokapsule
Imaris software
Bitplane



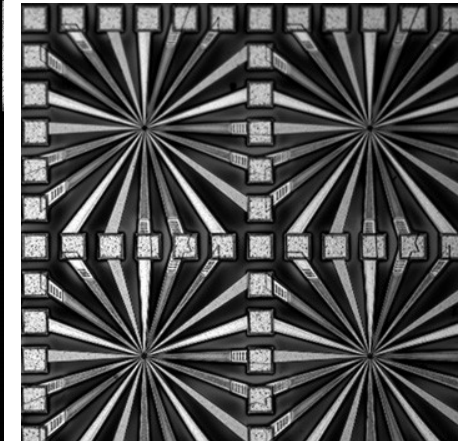
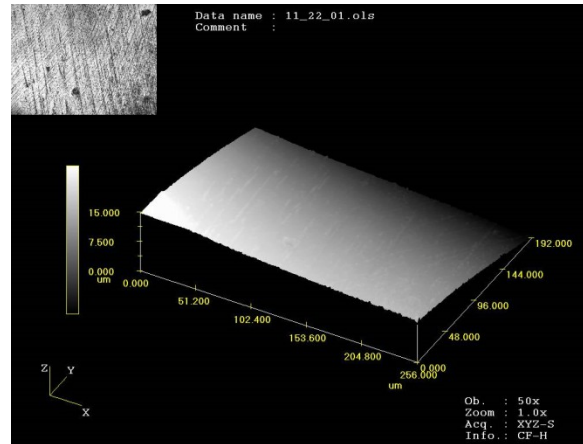
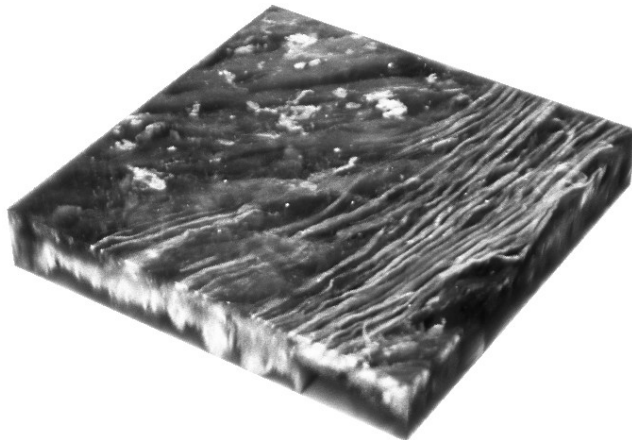
Tabák. b. v telofázi
Imaris software
Bitplane



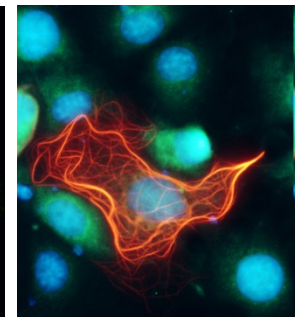
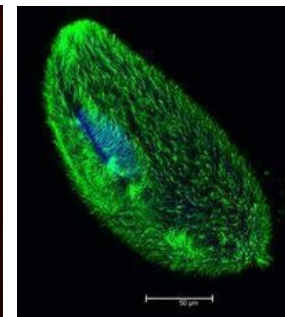
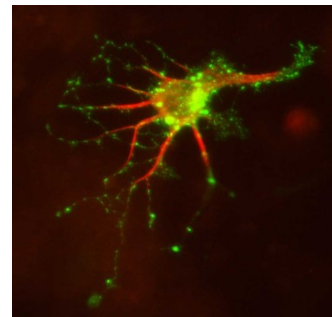
**Cytoskelet a
chloroplasty
tabáku**
LSM510 3D
module (Zeiss)

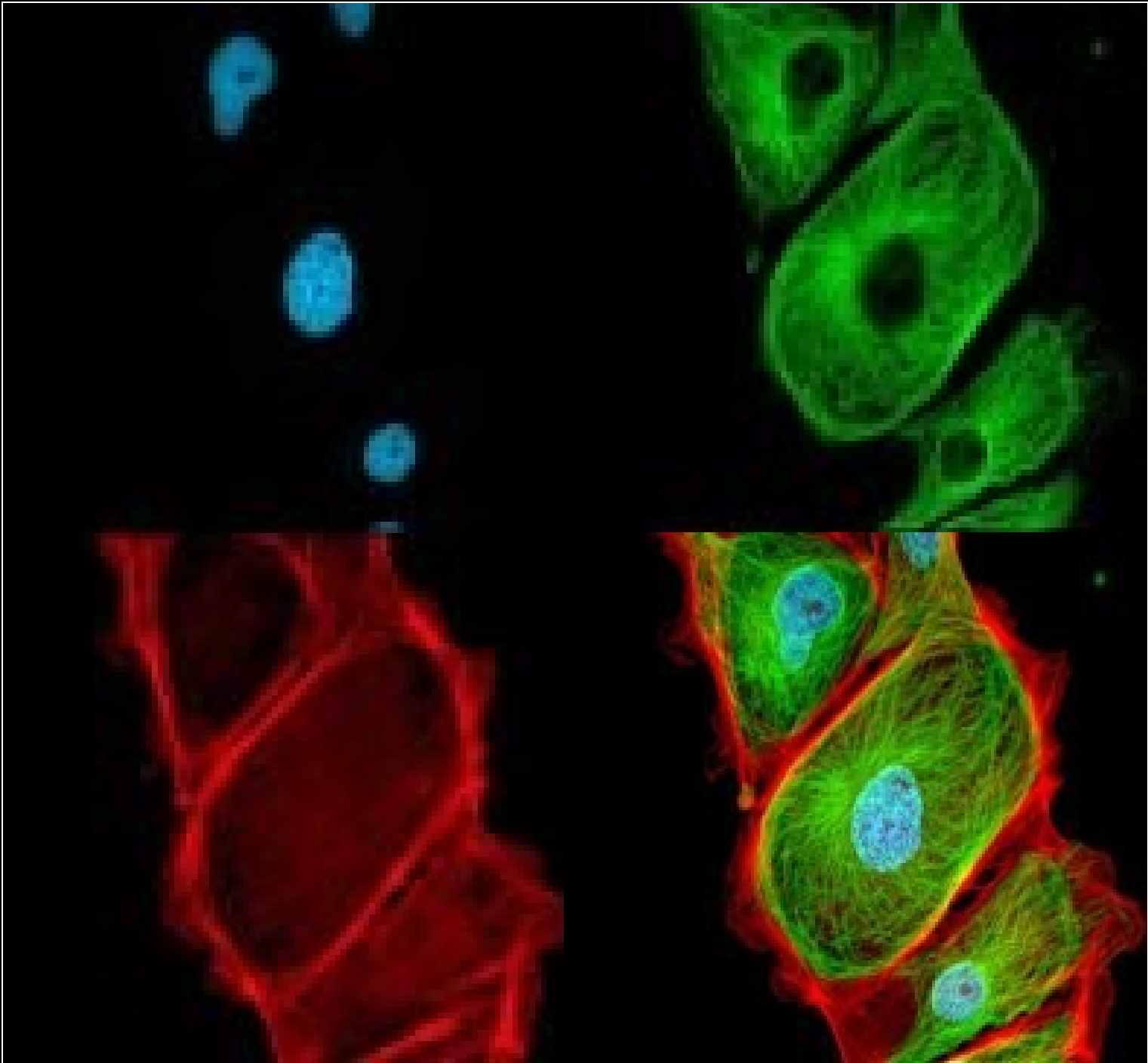
Využití světla pro CLSM

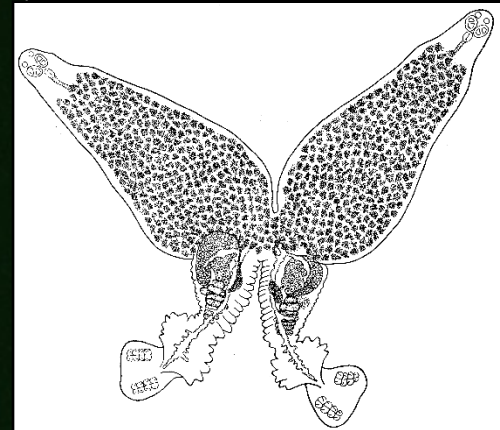
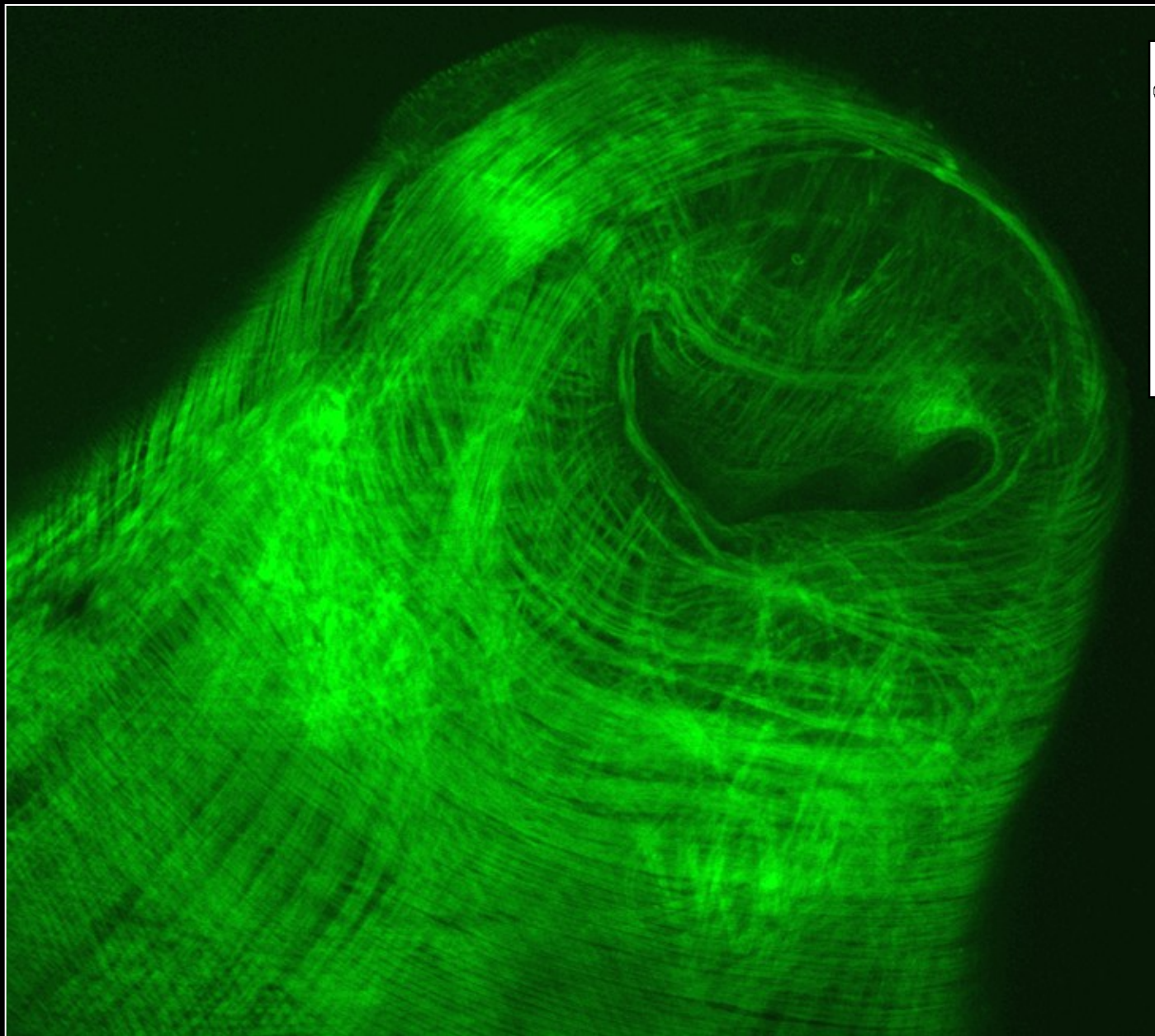
- reflexe - textura a složení povrchů - elektronických součástek, studium neuronových sítí (pomocí Ag), ...



- procházející světlo
- fluorescence - struktura buňky a tkání, studium metabolických drah, ...

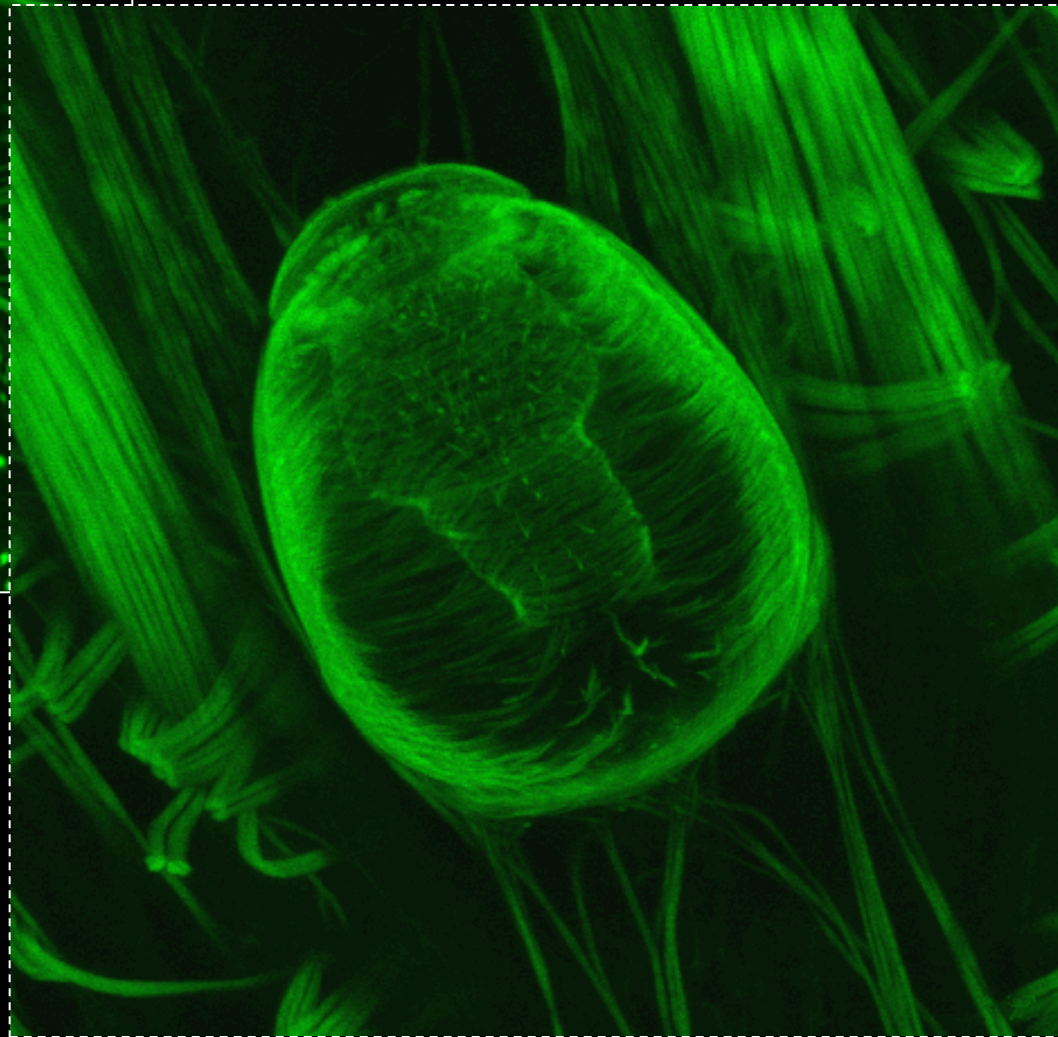
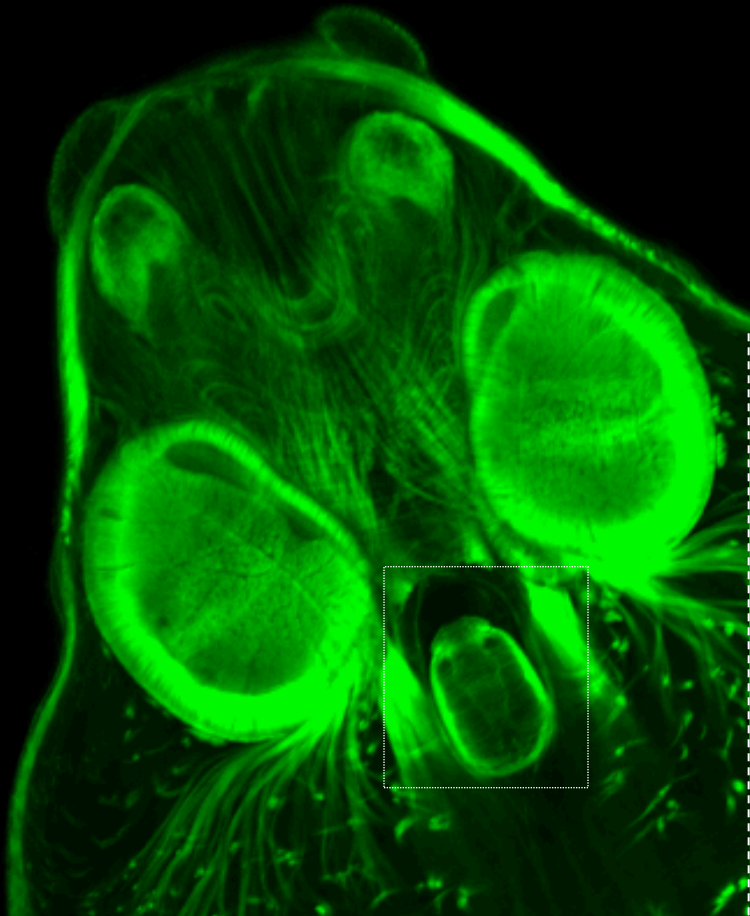


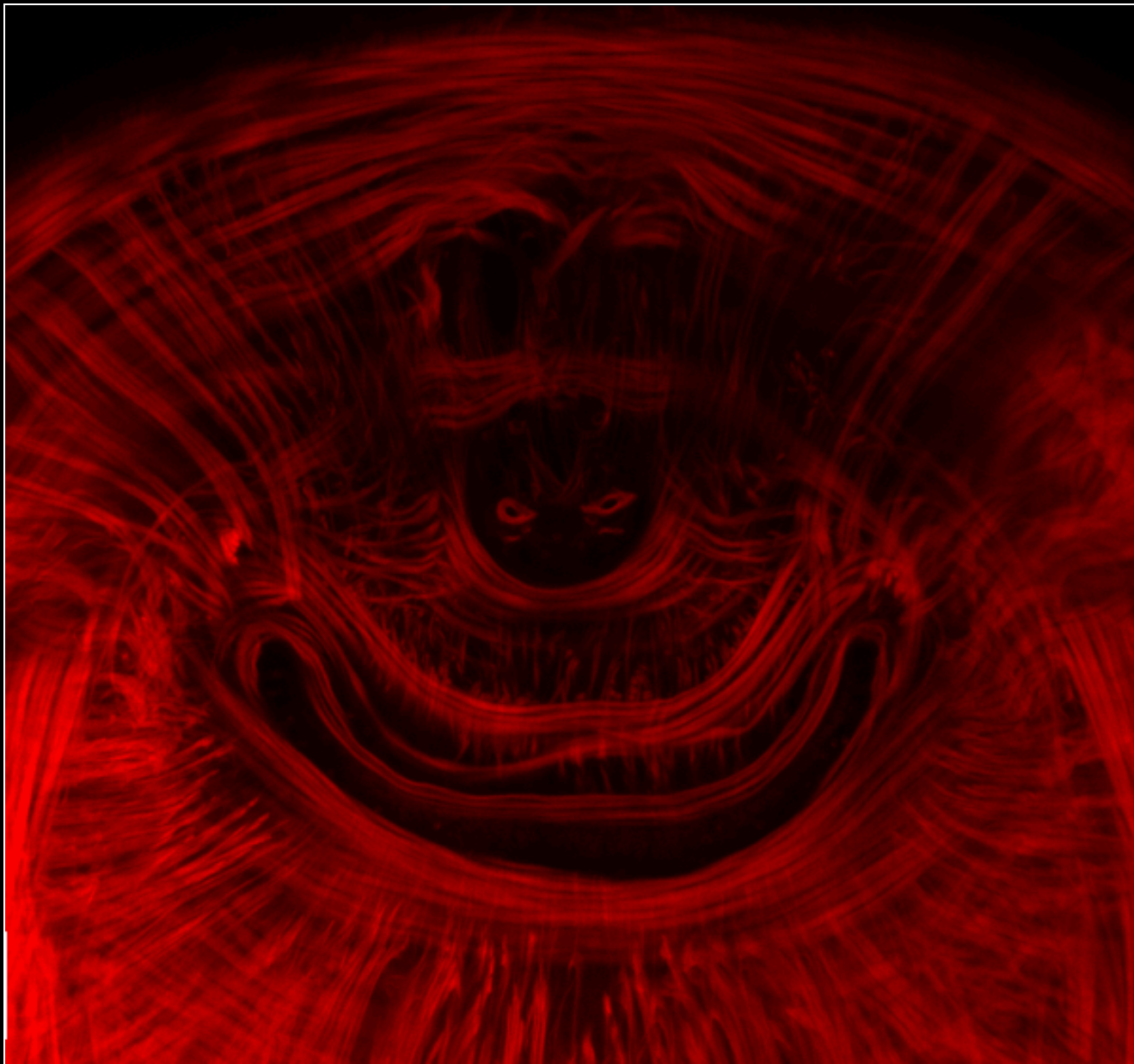




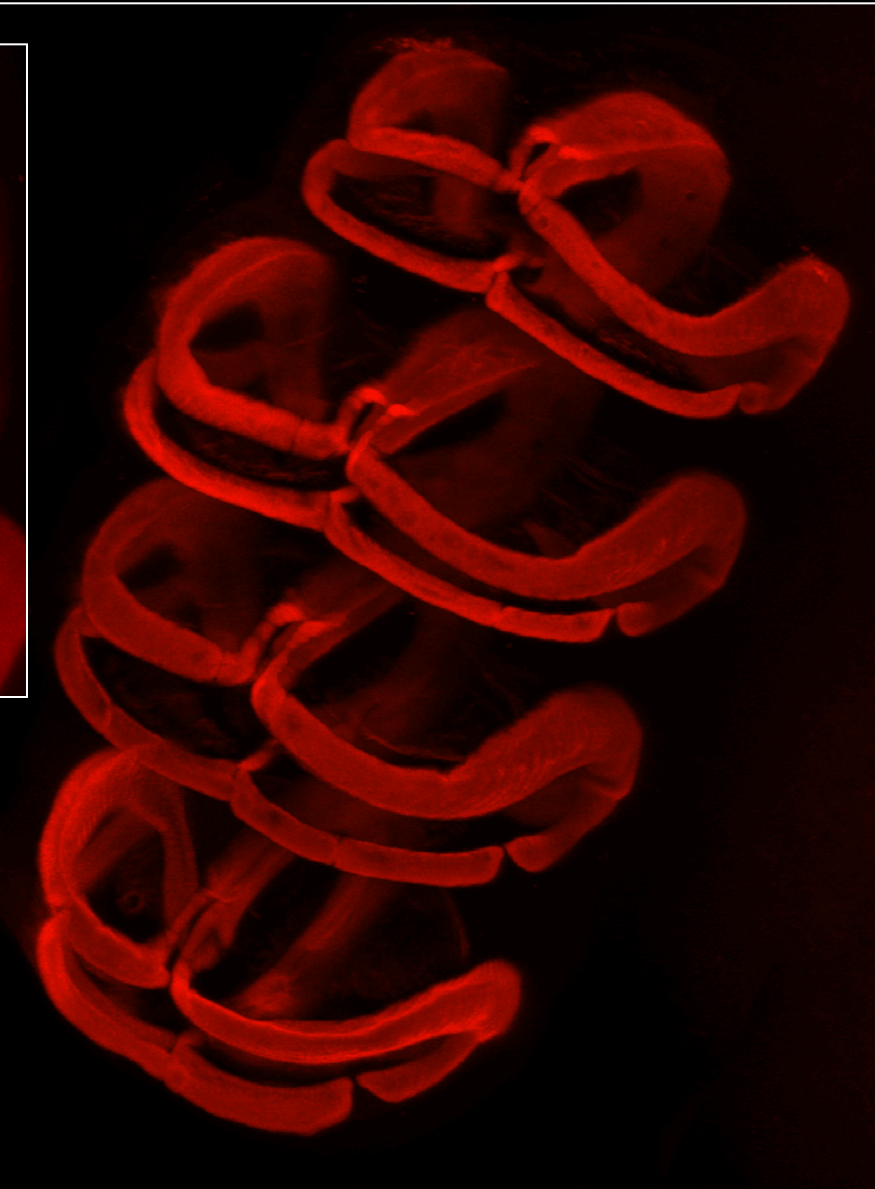
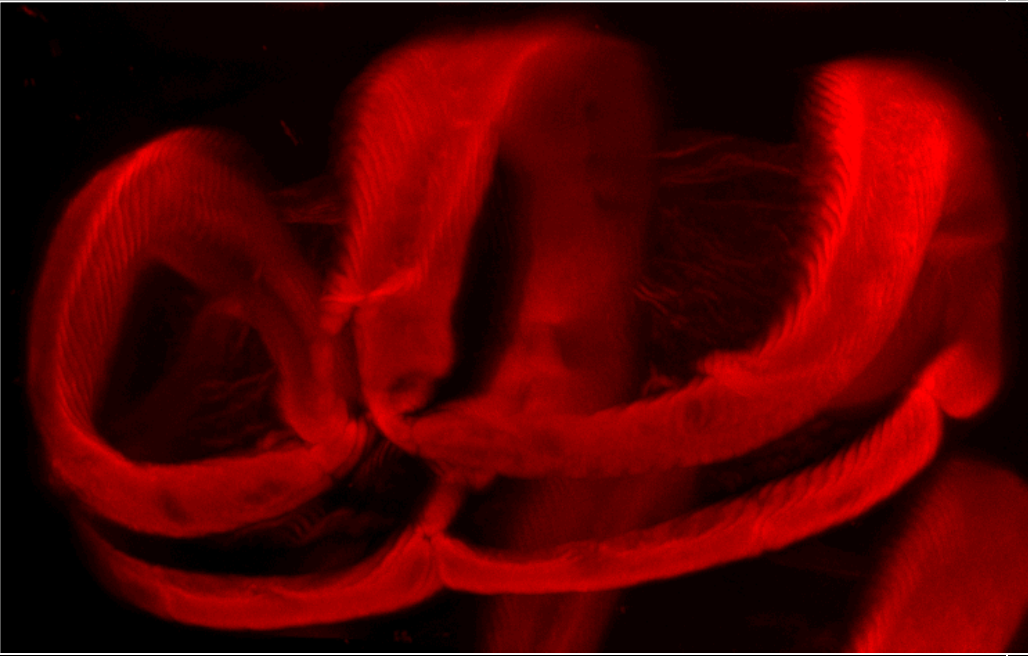
● vazba aktin-faloidin (FITC)

● vazba aktin-faloidin (FITC)

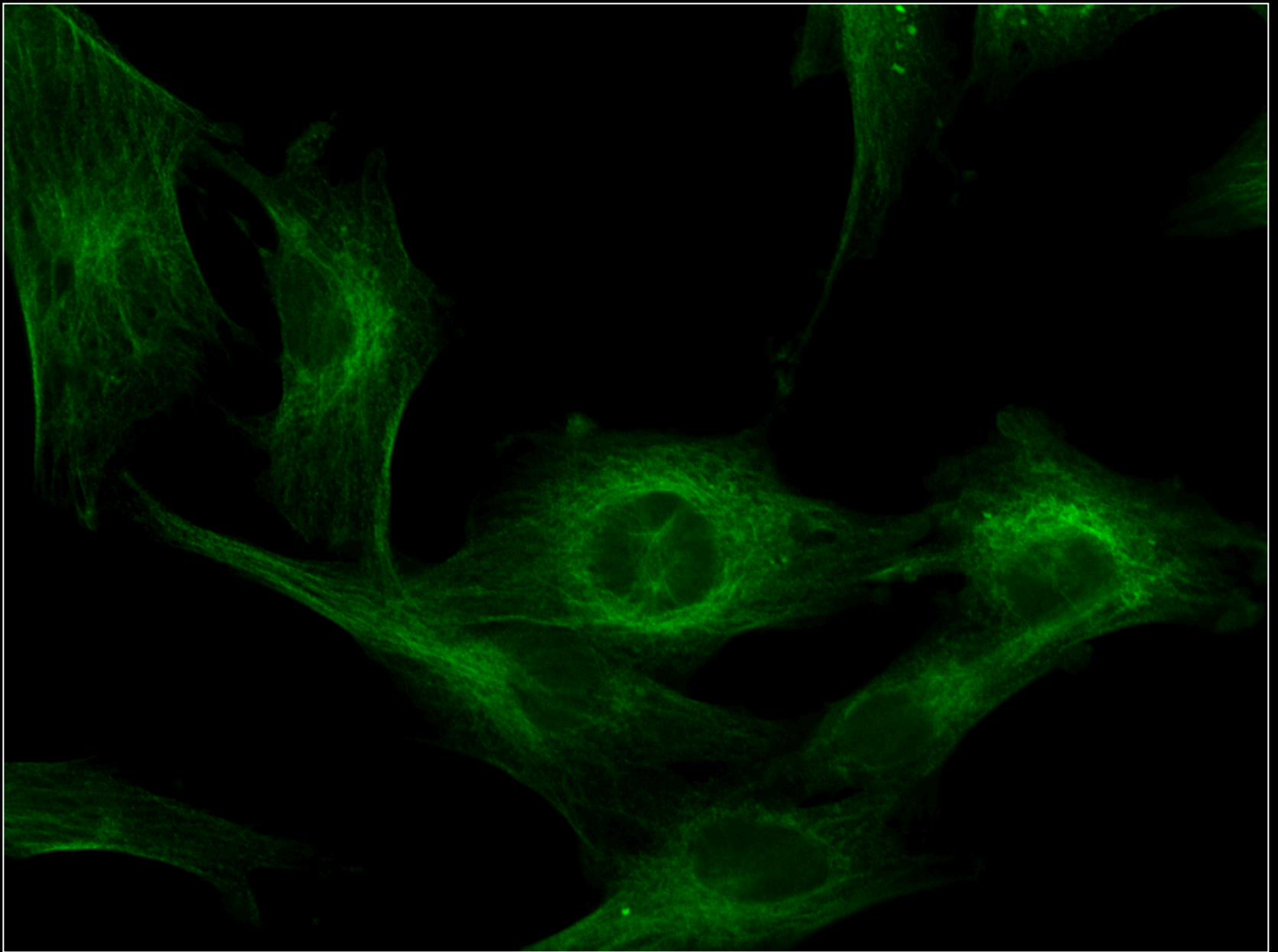




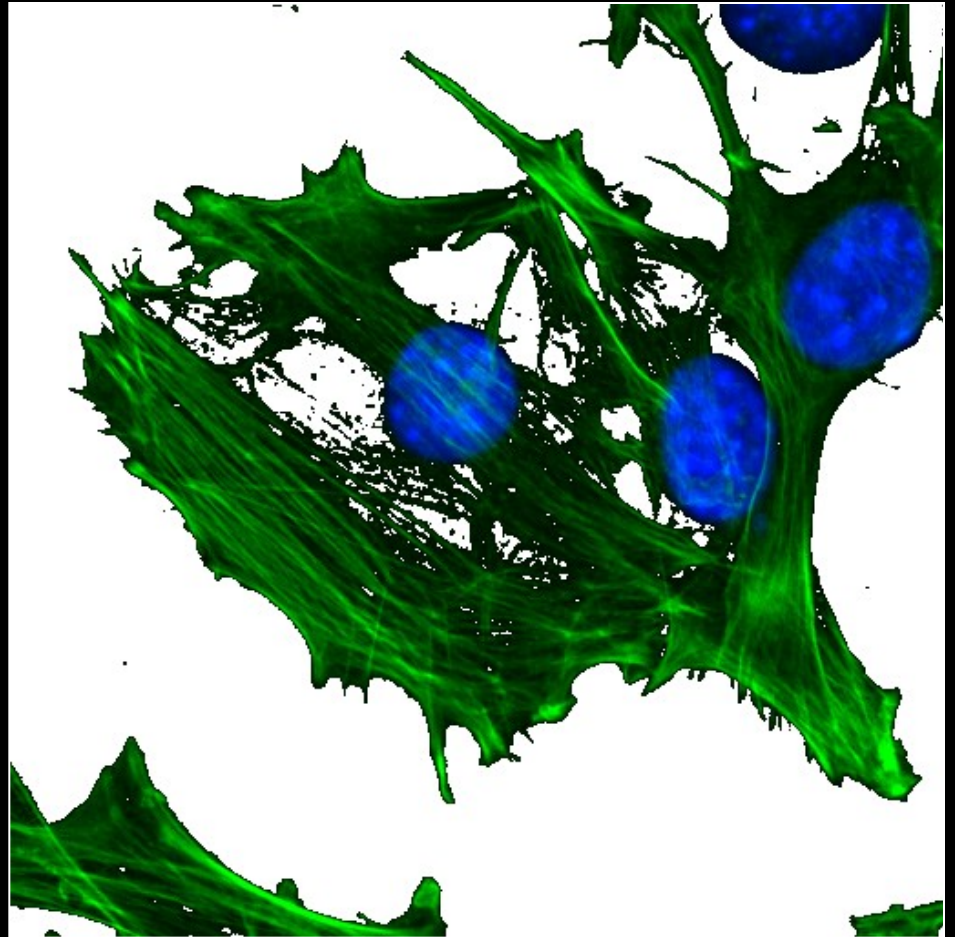
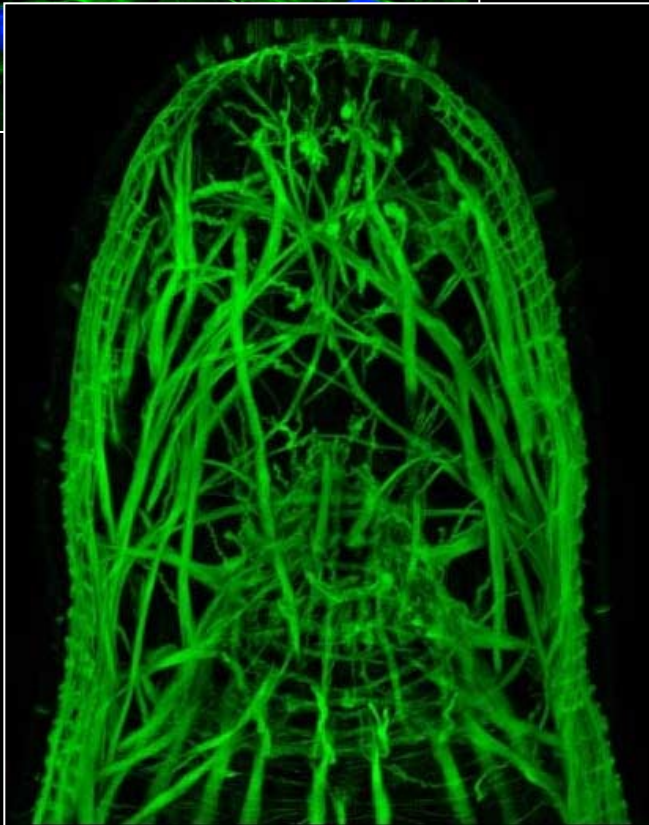
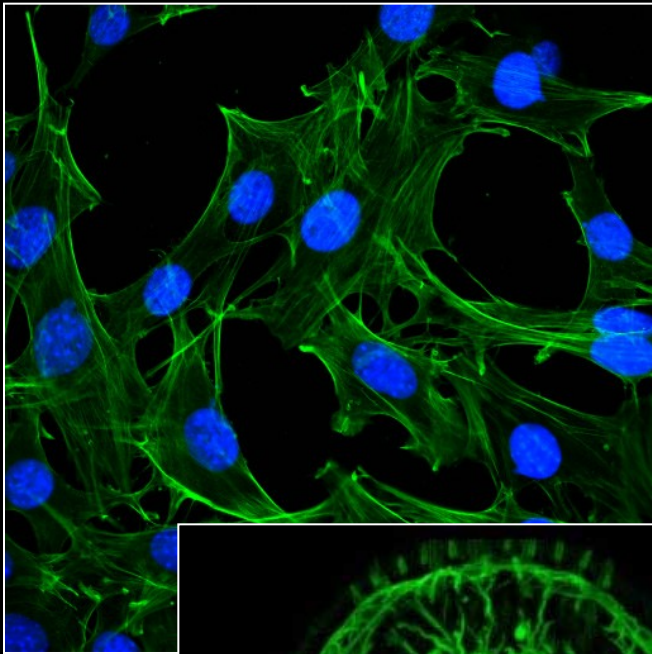
● vazba aktin-faloidin (TRITC)



● fluorescence Gomoriho trichomu

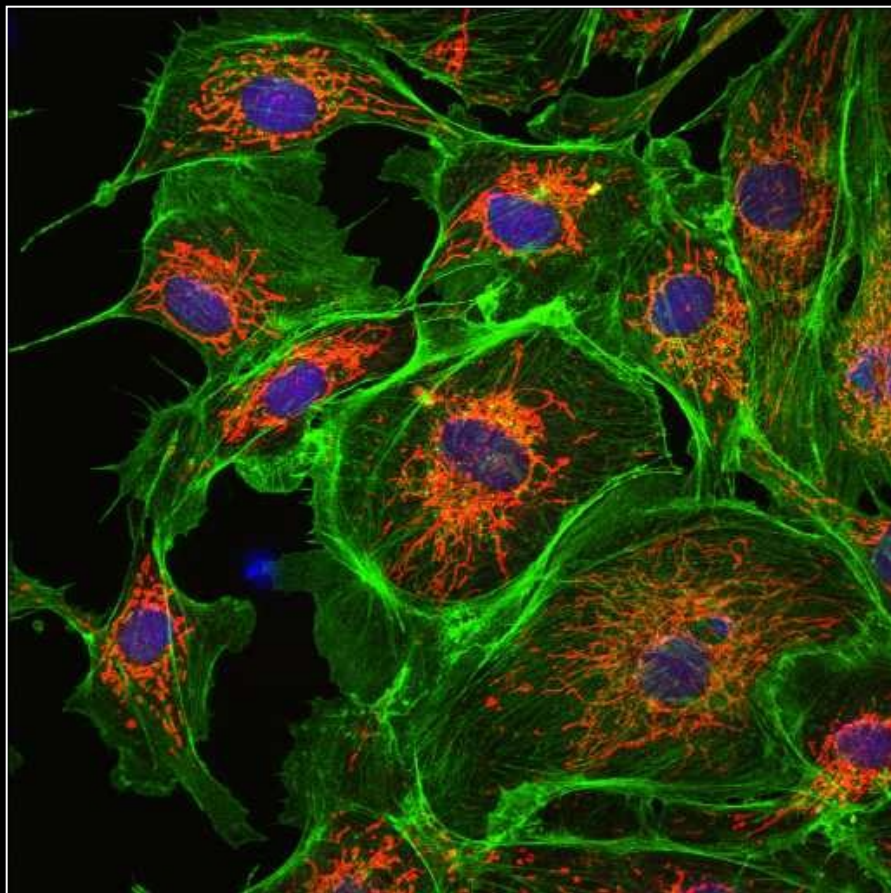


● vazba tubulin-protilátka (FITC)

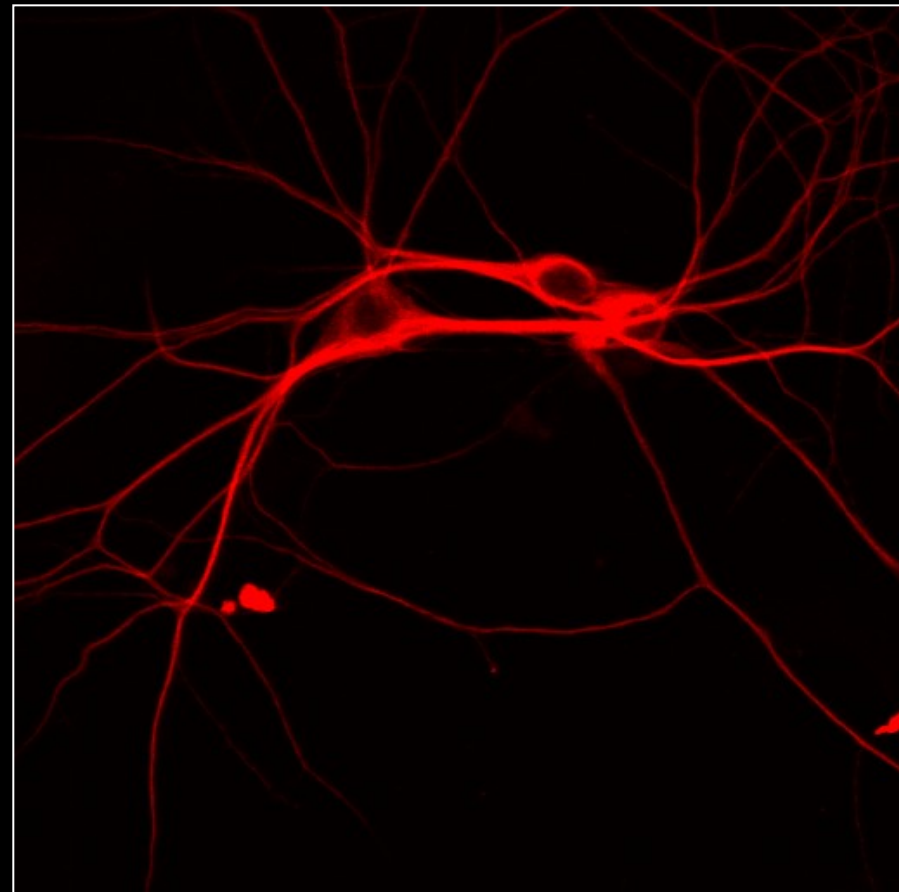


● vazba aktin-faloidin (FITC)

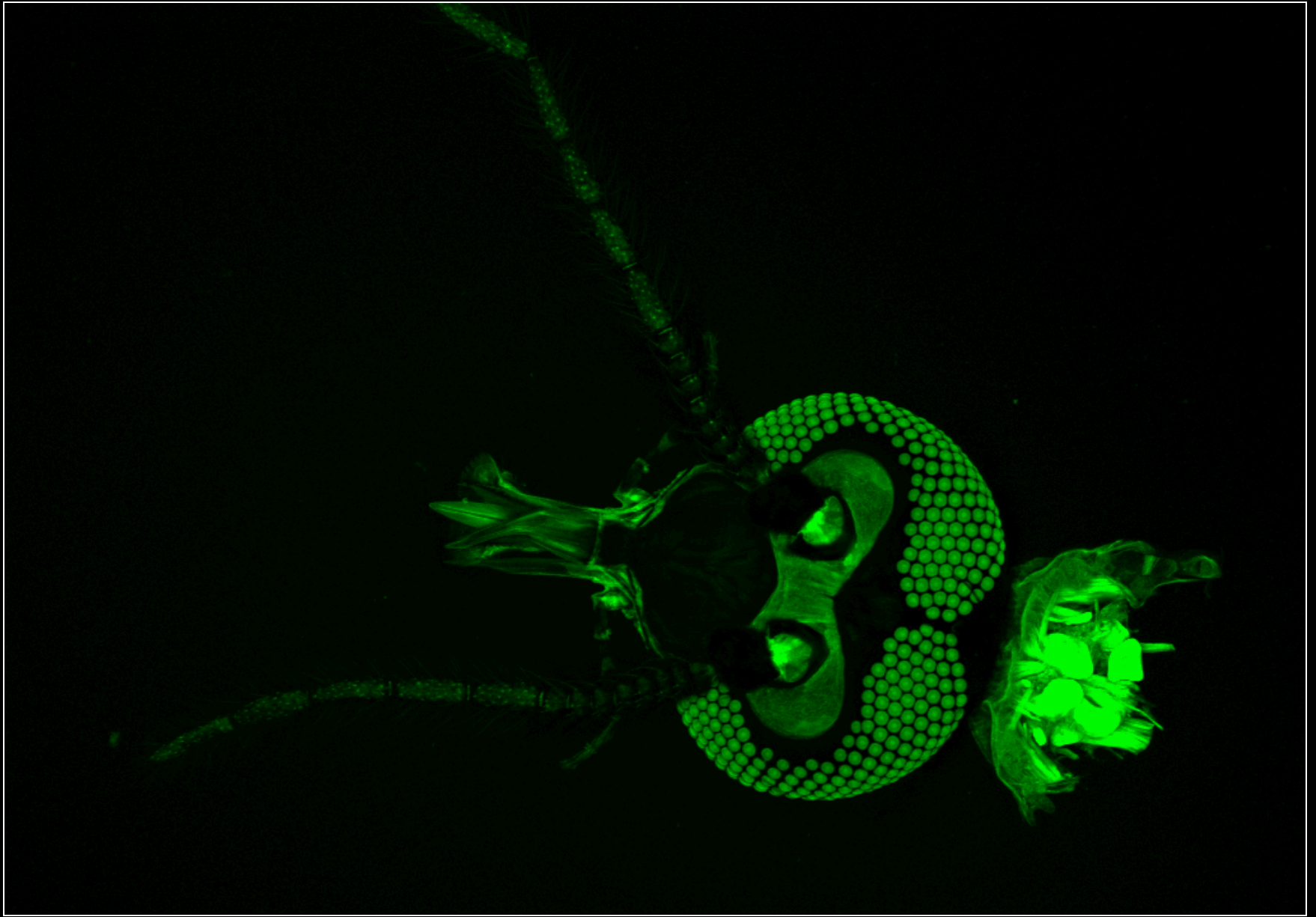
● vazba DNA-DAPI



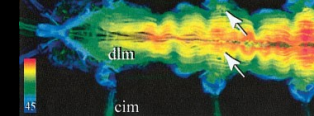
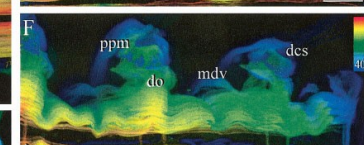
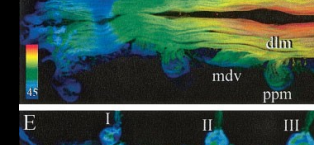
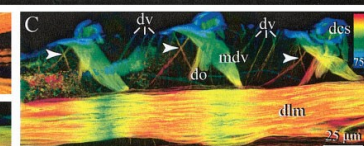
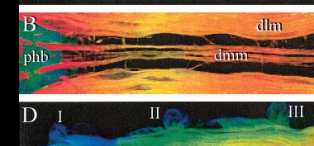
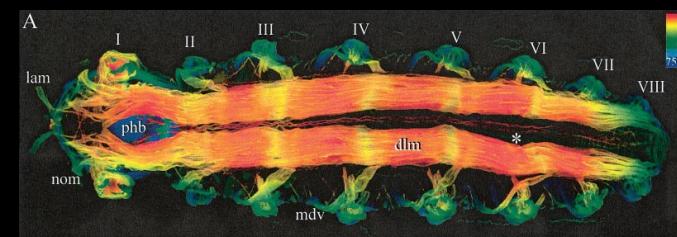
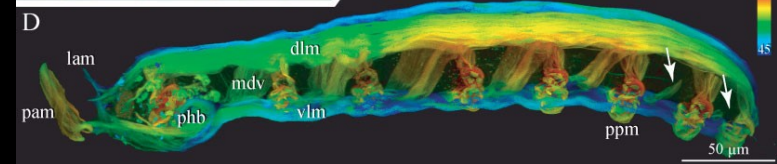
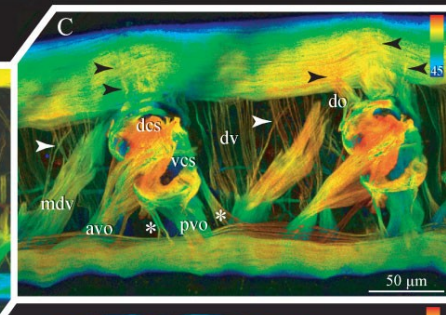
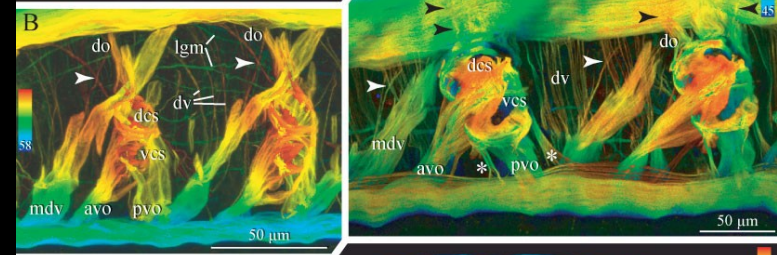
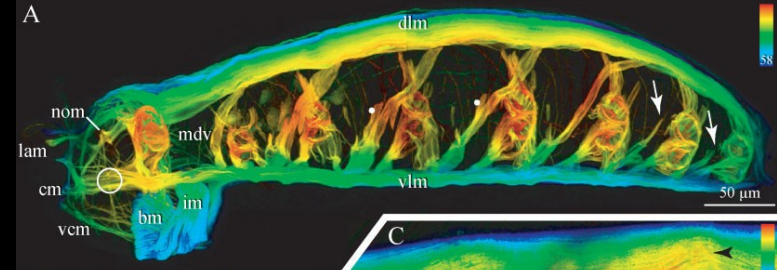
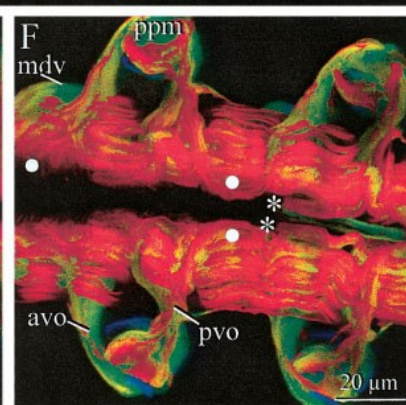
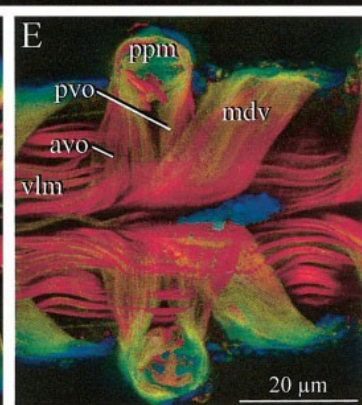
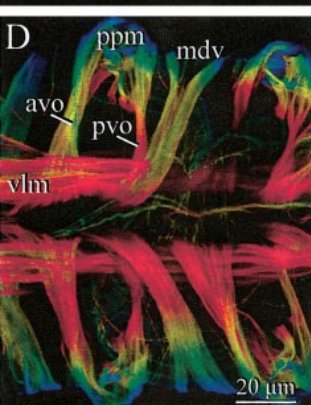
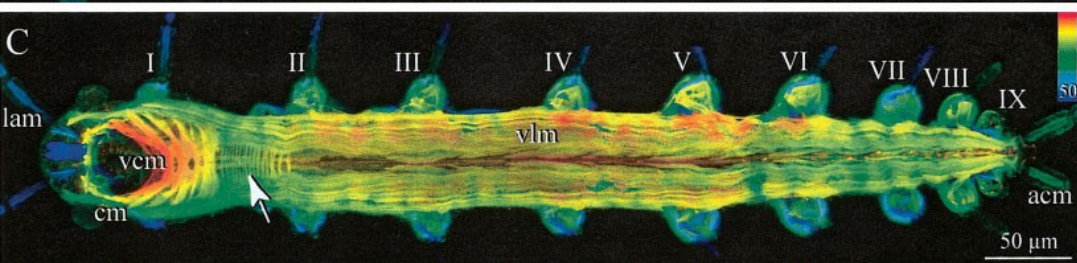
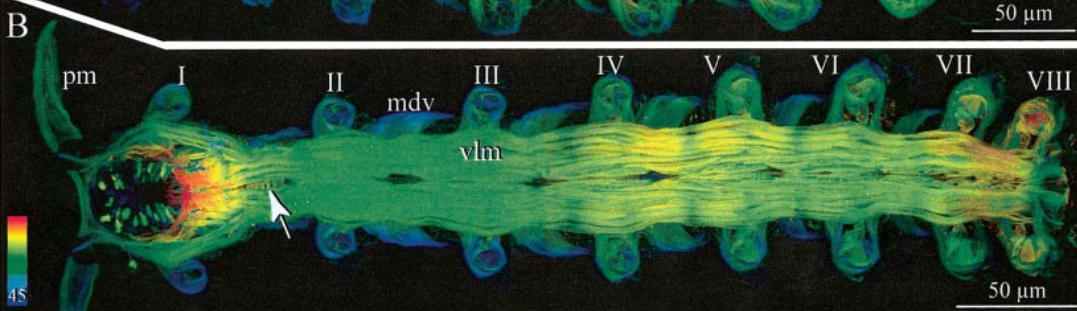
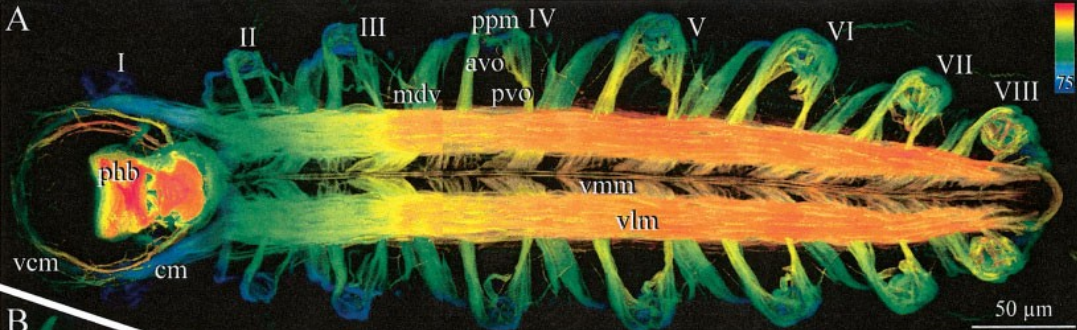
- vazba aktin-faloidin (FITC)
- vazba DNA-DAPI
- vazba mitochondrie-mitotracker red



- neuron, vazba mikrotubulové proteiny-protilátka (Texas-RED)

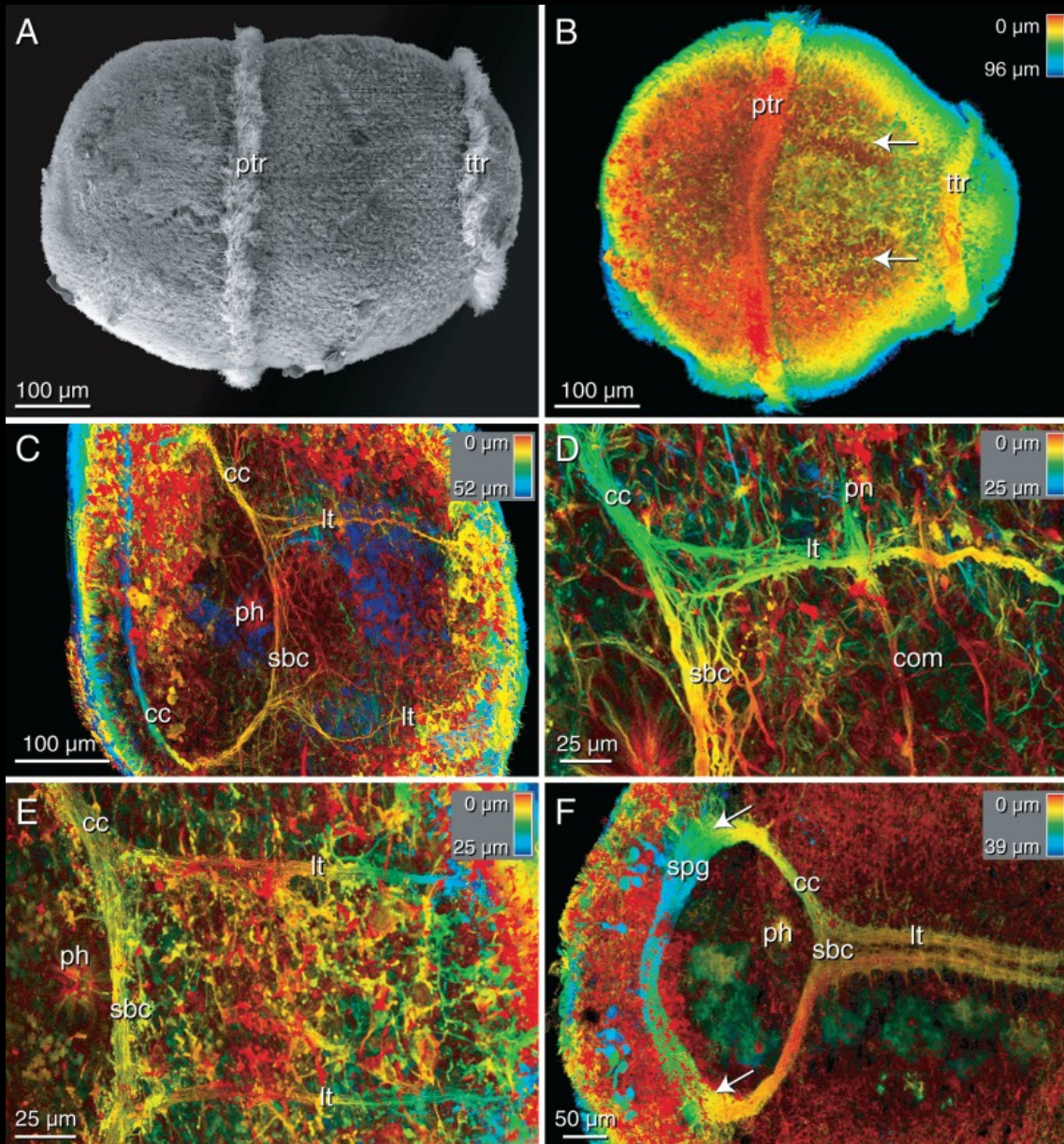


● autofluorescence



Muller, Worsaae (2006) Phalloidin, F-actin: Annelida; body wall musculature

NERVOVÝ SYSTÉM - *BONELLIA VIRIDIS* (ECHIUURA)



Anti-tyrosinated tubulin immunoreactivity, ventral view, depth-coding

sna>Venus + *Bra*>mRFP + *fkh*>Cerulean

Venus

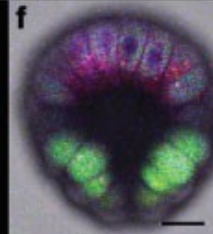
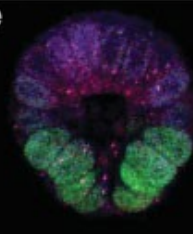
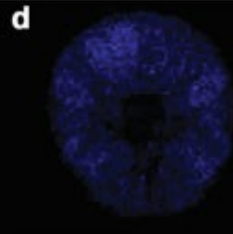
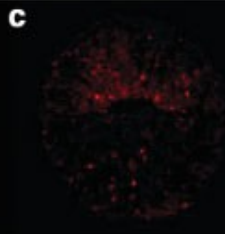
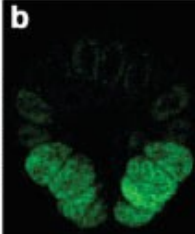
RFP

Cerulean

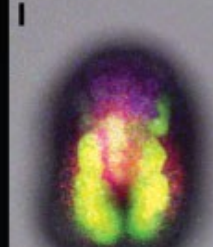
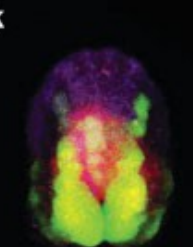
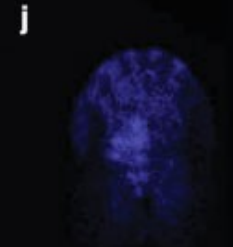
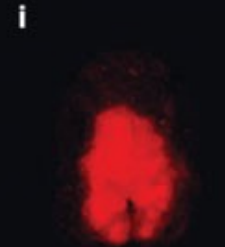
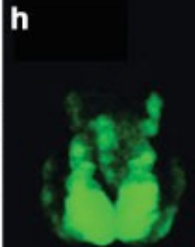
merge/df

merge/bf

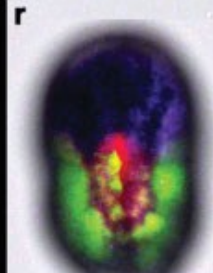
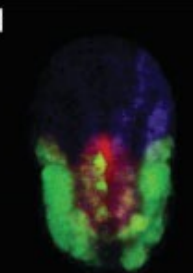
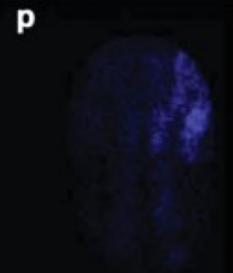
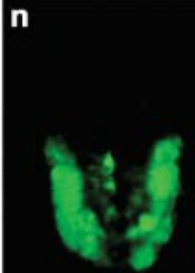
Gastrula



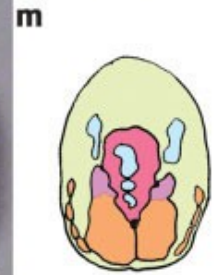
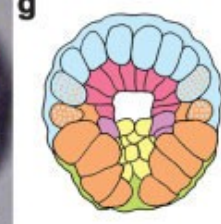
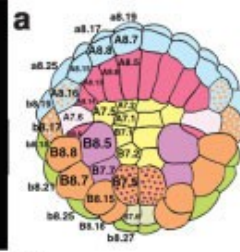
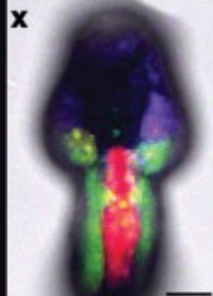
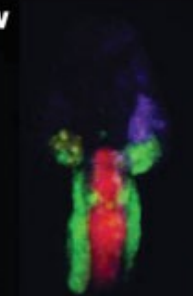
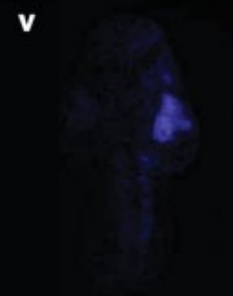
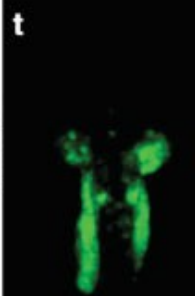
Neurula



Early Tailbud



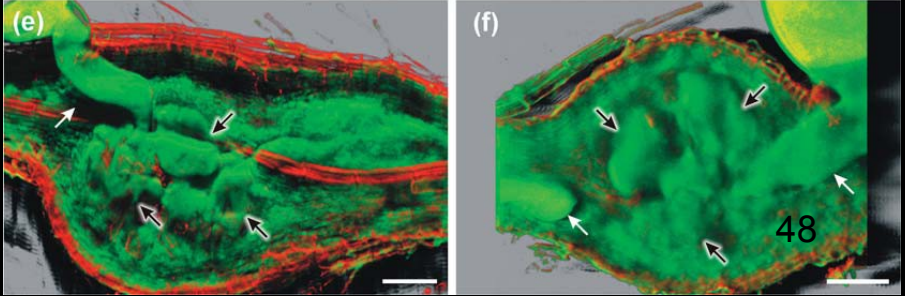
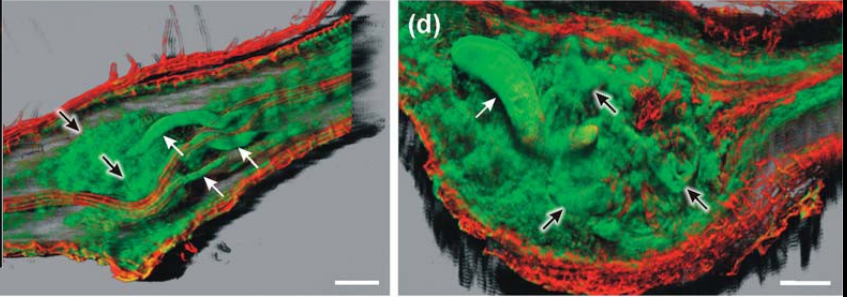
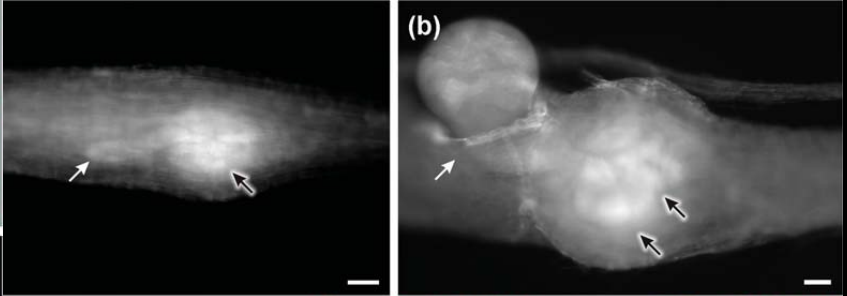
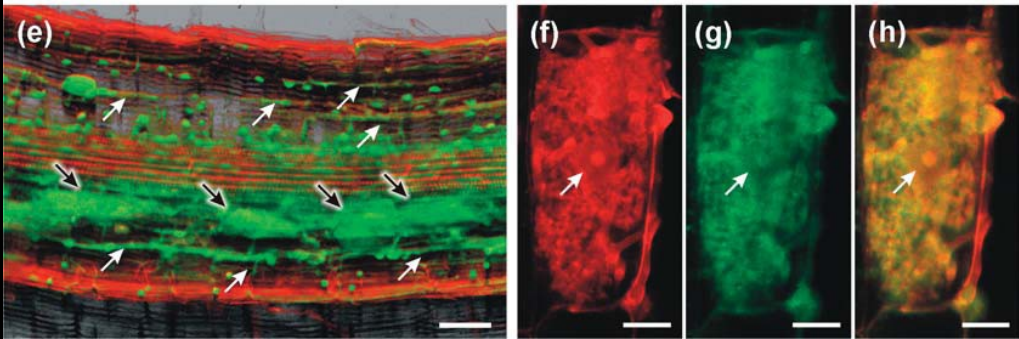
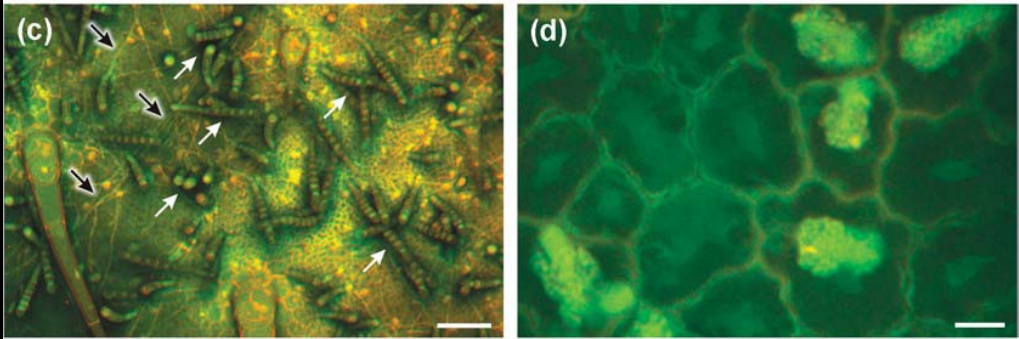
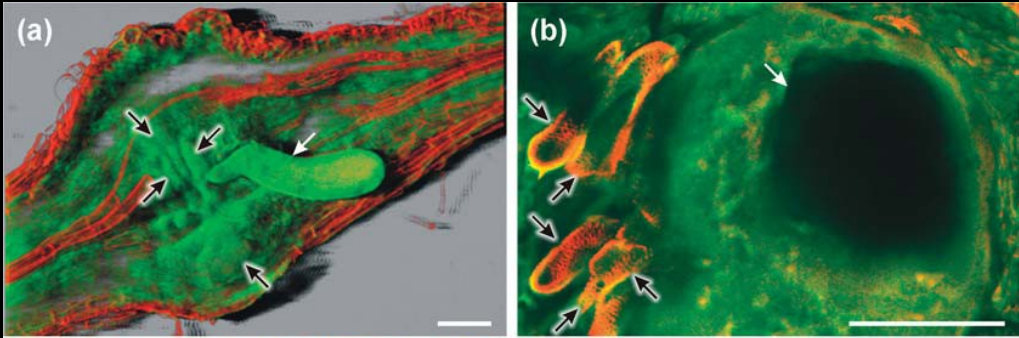
Late Tailbud



In vivo labeling of different embryonic territories with three spectrally distinct fluorescent proteins

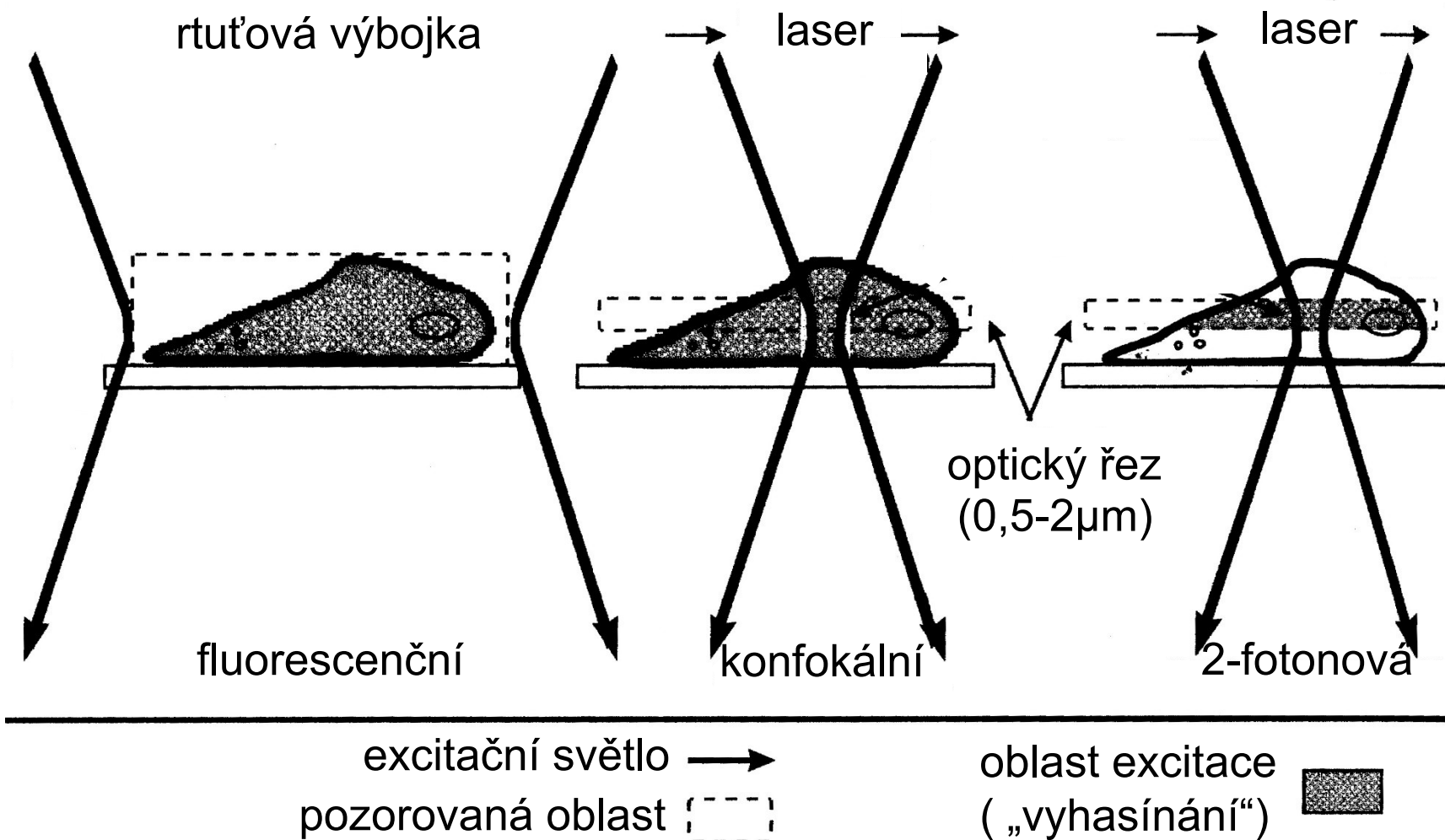
Rhee et al. 2005

**glutaraldehyde-introduced
fluorescence for
the microscopic analysis of plant
biotrophic interactions**



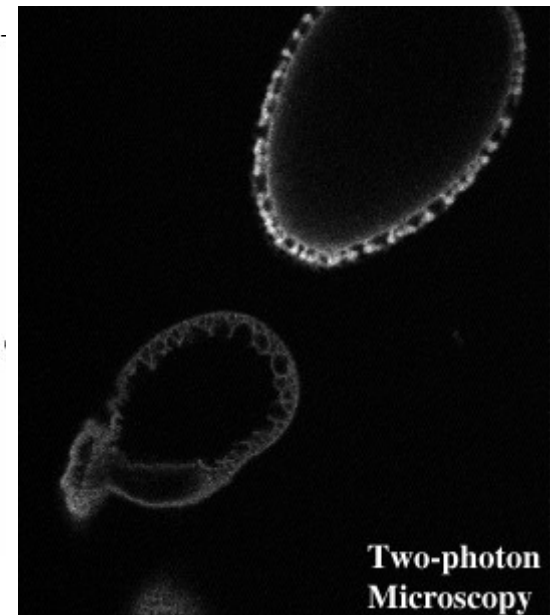
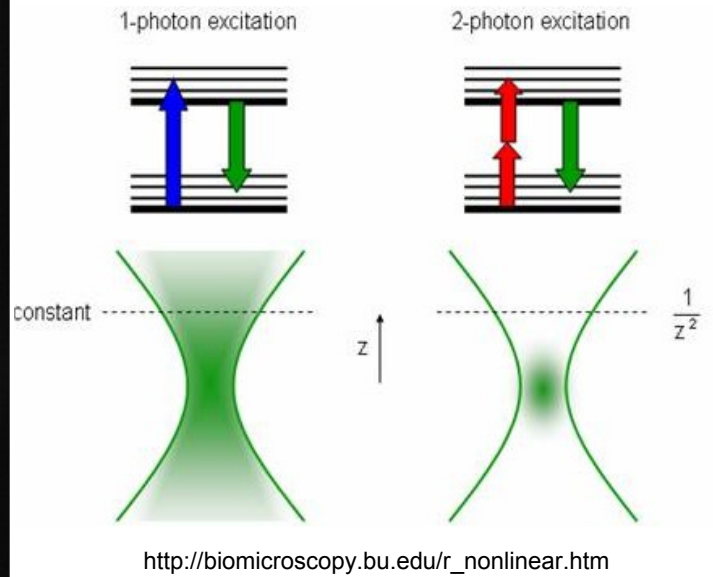
FESTER et al. 2008

Srovnání 3 metod užívaných ve fluorescenční mikroskopii



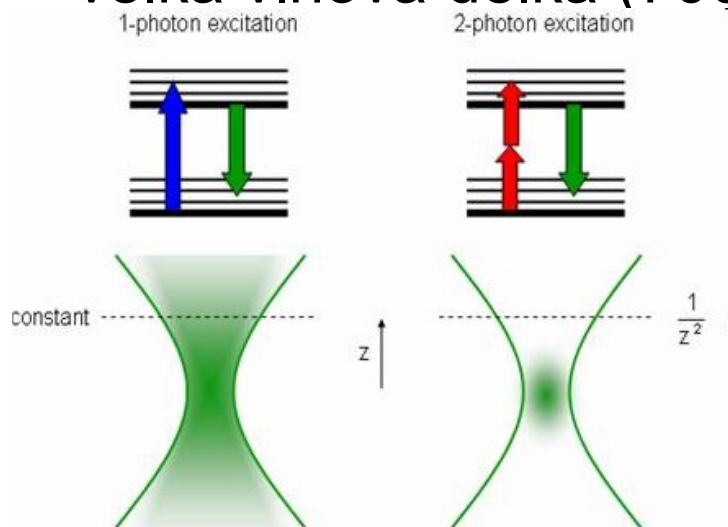
Dvoufotonová mikroskopie

- absorpce 2 fotonů fluorochromem ve stejném okamžiku => záření s dvojnásobnou vlnovou délkou (poloviční energie) => excitační záření 700 nm (červená) => emitované záření 900 nm



Výhody

- se zvyšující se intenzitou záření zdroje se zvyšuje pravděpodobnost absorpce 2 fotonů fluorochromem
- excitace fluorochromu jen v zaostřené rovině => odpadá nutnost konfokální clonky => maximum světla
- velká vlnová délka (700 nm) => pomalejší „vyhasínání“



menší rozptyl světla ve vzorku
větší penetrace světla ve vzorku
malá fototoxicita (x UV záření)

Nevýhody

- cena Ti:Sapphire laseru
- ohřev vzorku => užití laserových pulsů než plynulé ozáření

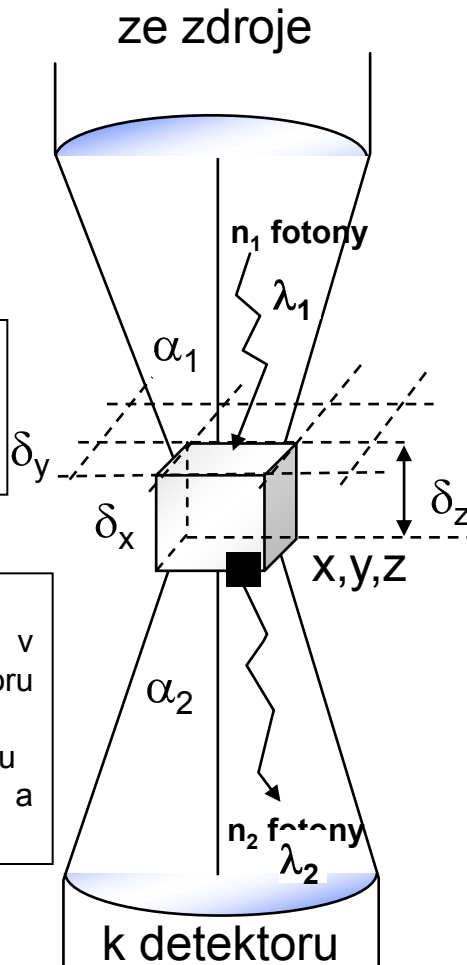
Základní omezení konfokální mikroskopie

PIXEL

- picture element, obrazový prvek
- někdy též pel, dále zkracováno na px
- nejmenší jednotka digitální rastrové grafiky
- jeden bod obrázku zadaný svou barvou

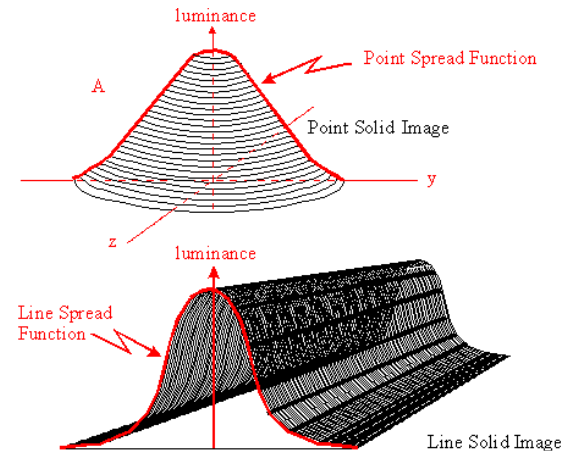
VOXEL

- (*volumetric* – objemový + pixel)
- částice objemu, představující hodnotu v pravidelné mřížce třídímenzionálního prostoru počítačové grafiky
 - analogie k pixelu, který reprezentuje 2D grafiku
 - voxely se používají nejčastěji při vizualizaci a analýze lékařských a vědeckých dat



konvoluce

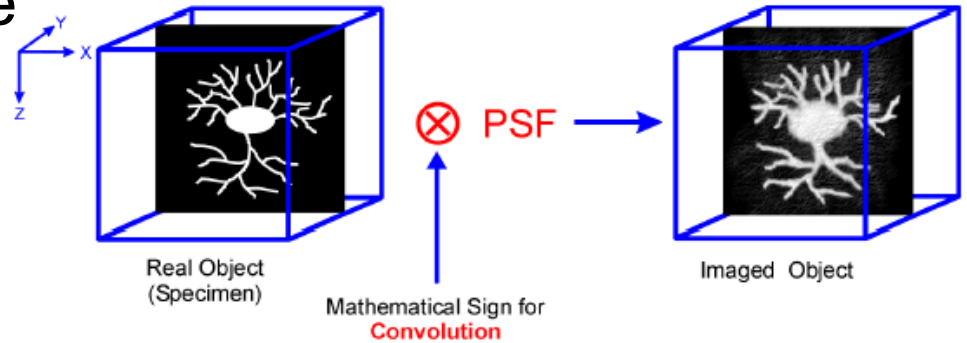
- zkreslení díky nedokonalosti optických zařízení
- bodová rozptylová funkce = PSF - Point Spread Function - důvod „rozmazání“ obrazu



Sketches illustrating a point spread function (A) and a line spread function (B).
Adapted from Smith (1966)

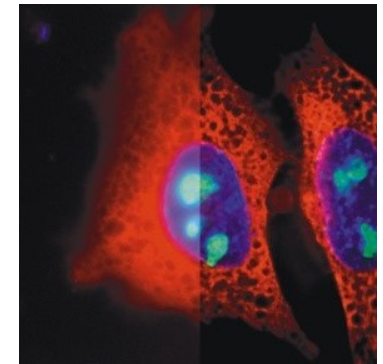
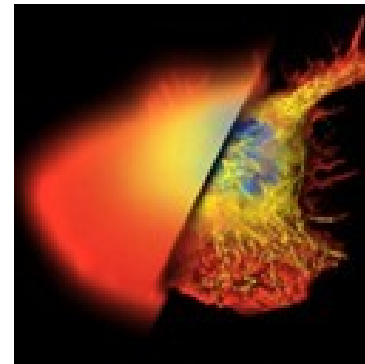
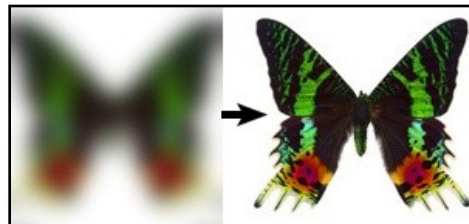
[Table of Contents](#)

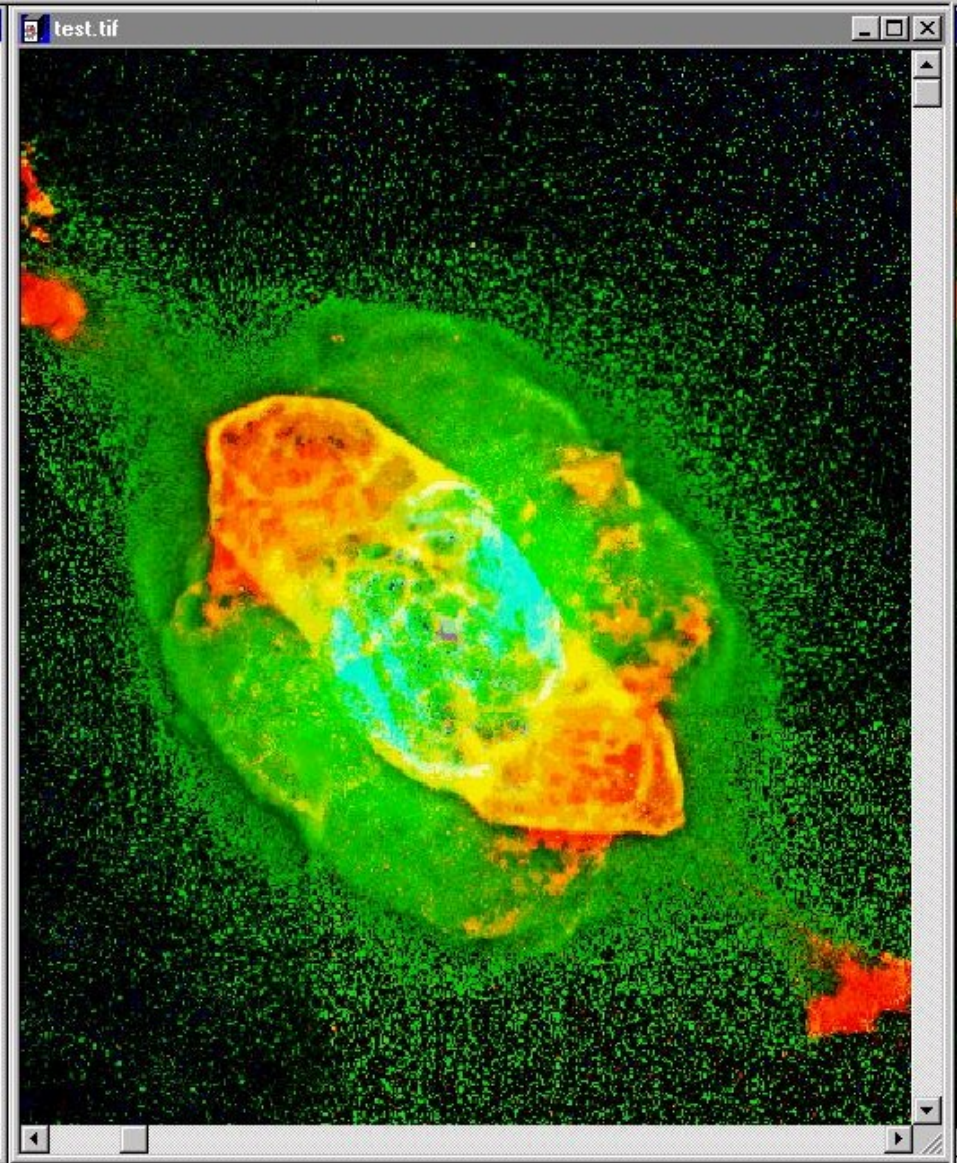
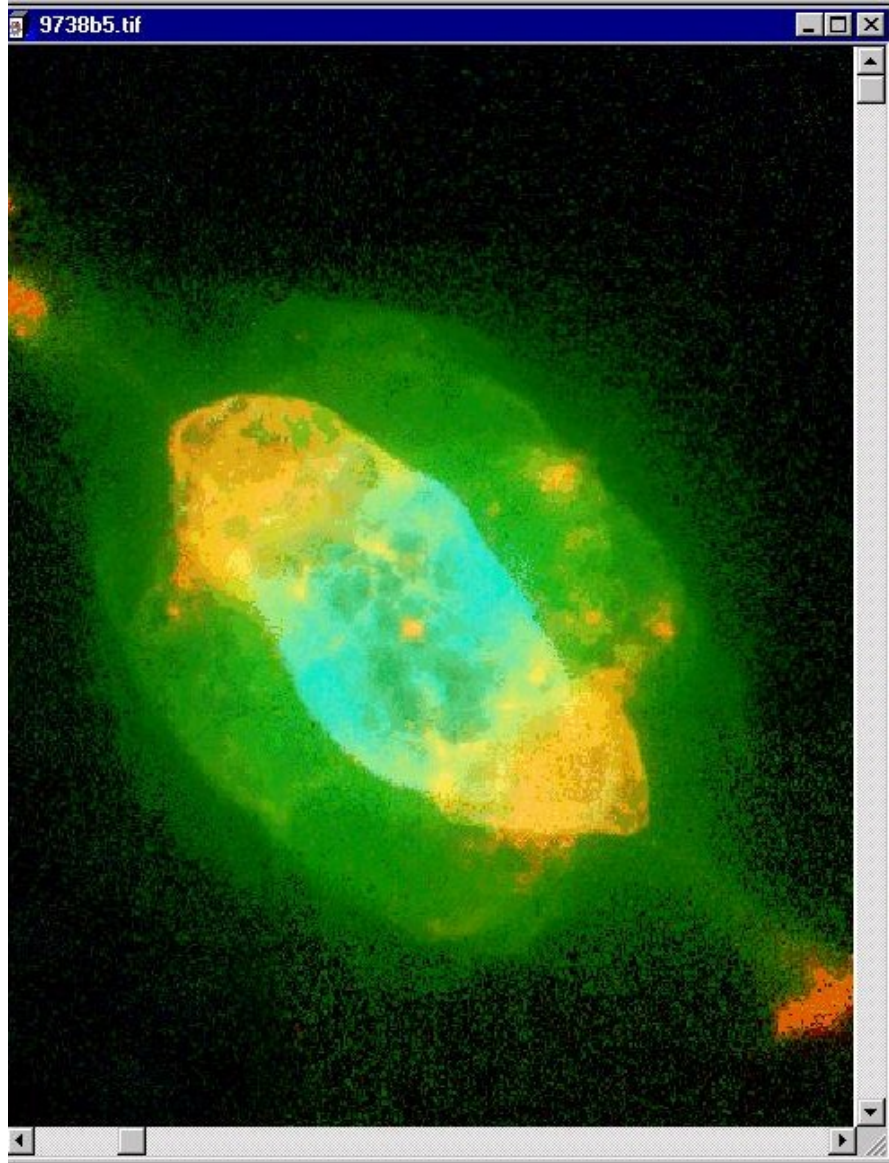
[Spread Functions](#)

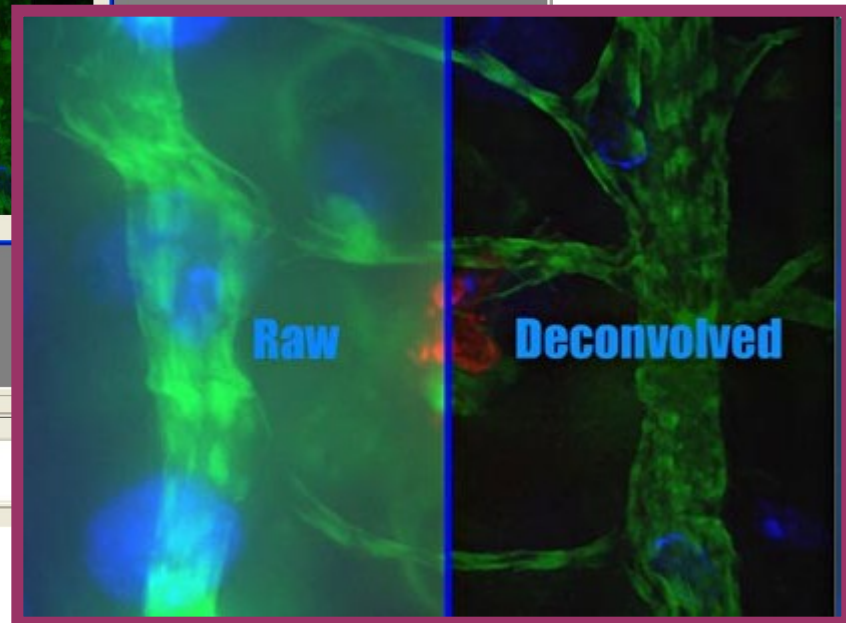
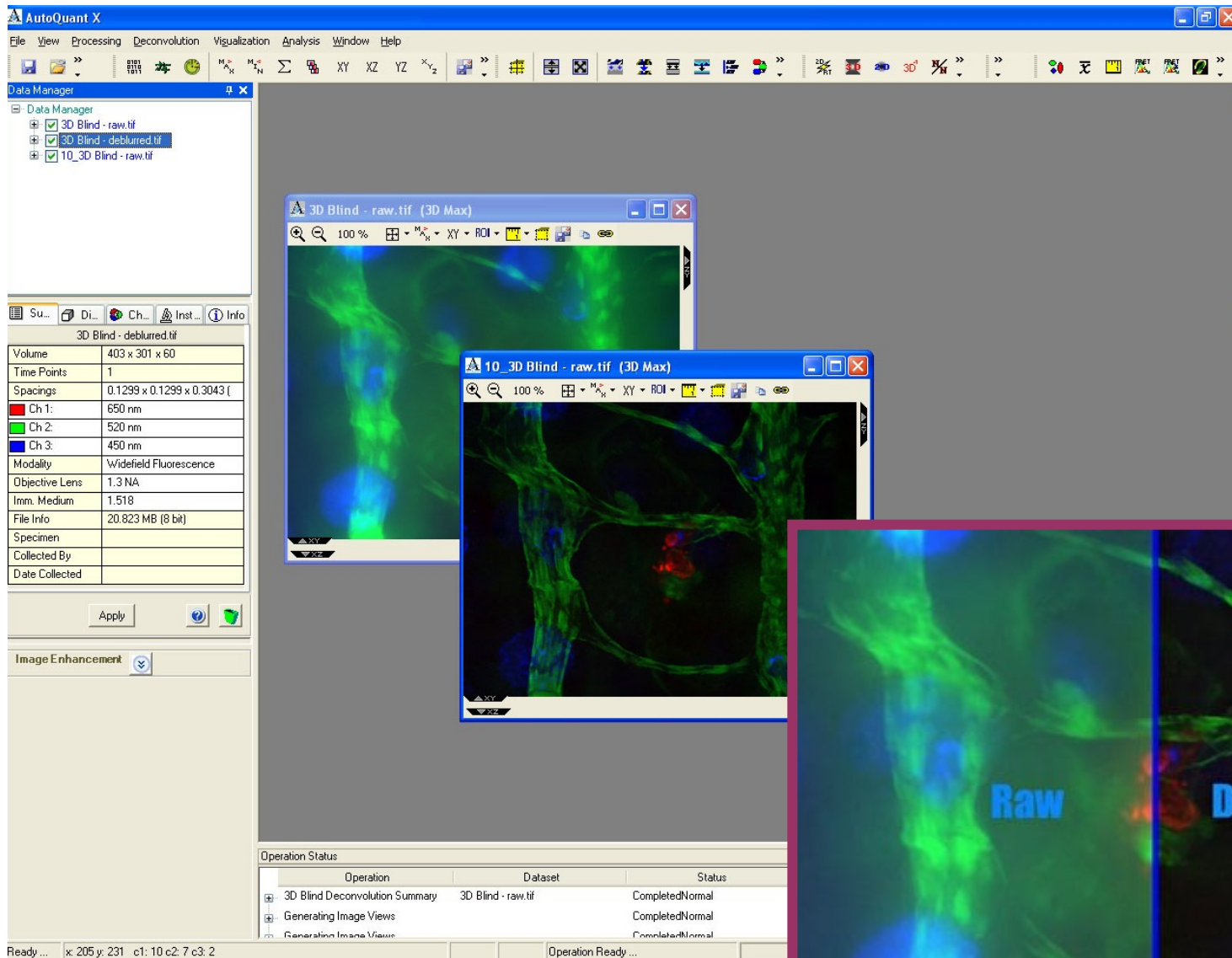


dekonvoluce

matematické zpracování obrazu, které redukuje rozmazání obrazu a vylepšuje kontrast a rozlišení







AutoDeblur® AutoQuant®

55

<http://spectraservices.com/DEBLUR.html>

Informační zdroje

- <http://www.olympusconfocal.com/theory/LSCMIntro.pdf>
- <http://www.fmhs.auckland.ac.nz/sms/biru/gallery/clsm-images.aspx>
- http://www.bcm.edu/cairn_foundation/noframes/html/pages/staff/robert_mcneil.htm
- *Clypeaster subdepressus* larva: <http://mestrado.organelas.com/en/category/confocal/>
- <http://www.confocal-microscopy.org/>
- http://measure.feld.cvut.cz/groups/edu/sz2/prednasky/2sadaPrednasky/Princip_konfo_kalni_mikroskopie.pdf
- <http://www.physics.emory.edu/~weeks/lab/papers/ebbe05.pdf>
- <http://www.olympusfluoview.com/theory/LSCMIntro.pdf>
- <http://apfyz.upol.cz/ucebnice/down/optmikro.pdf>
- Fluorofory: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>

Literatura

