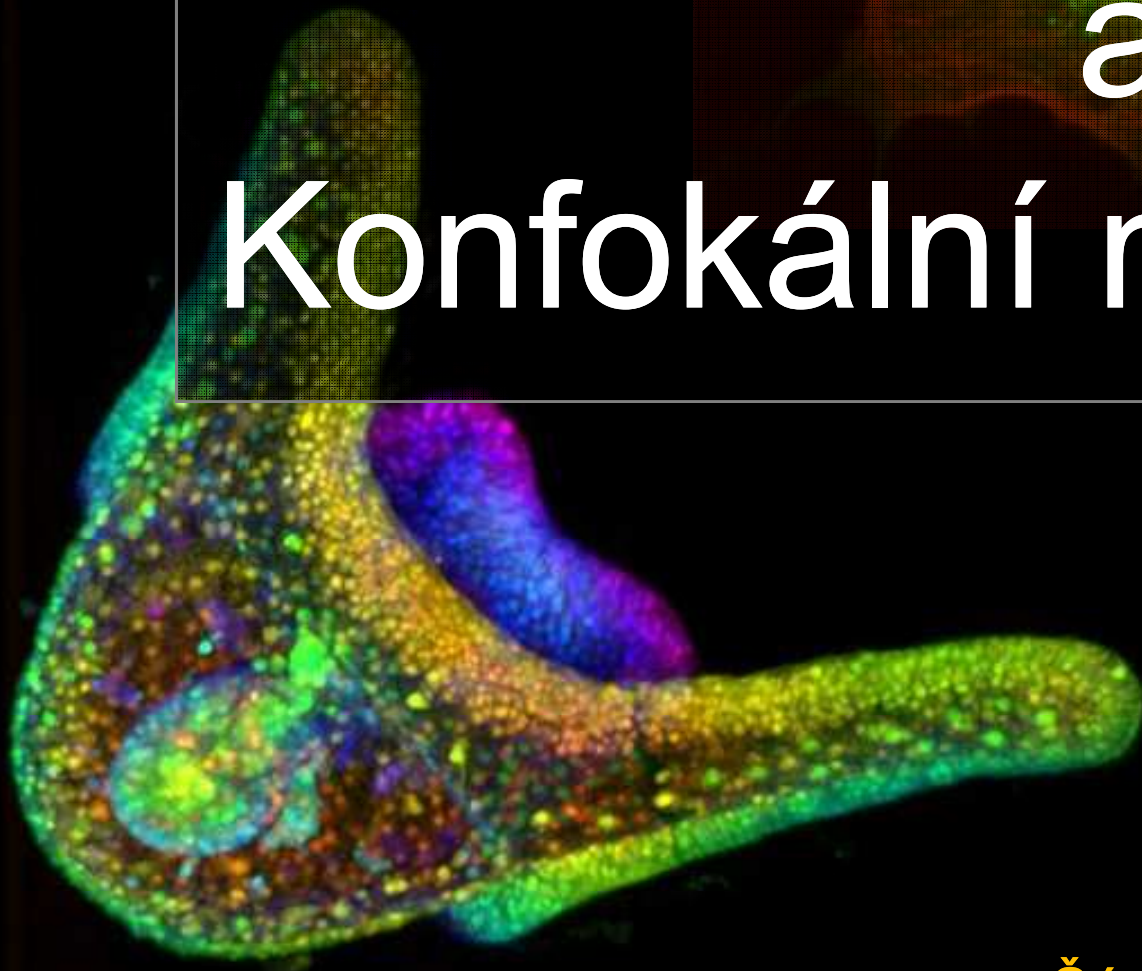


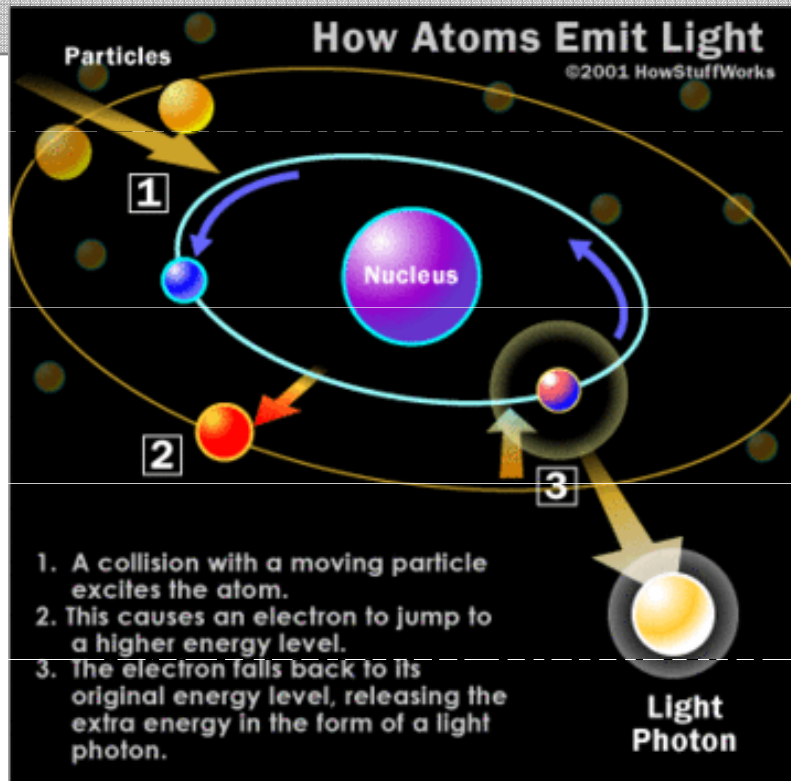
# Fluorescence a Konfokální mikroskopie



# 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
  - konfokál, spinning disk, 2 foton
  - TIRF, FRAP, FRET, FLIM, iFRAP, FCS ...
  - PALM, STED, STORM, SIM, (super-resolution)
- **Stále ve vývoji**

# Princip fluorescence



luminiscenční záření

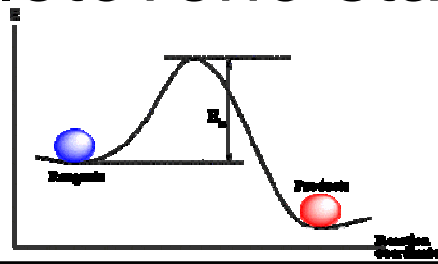
podávajícího záření (absorbce)

částic

í, které je charakterizováno

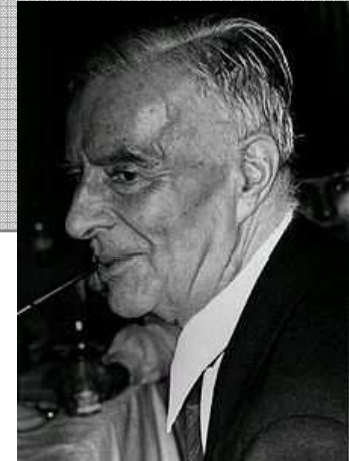
ve velmi krátké době (řádově

- emitované záření je vyzářeno atomem, který energii pohltí
- přechod z prvního singletového stavu ( $S_1$ ) do singletové hladiny ( $S_0$ )



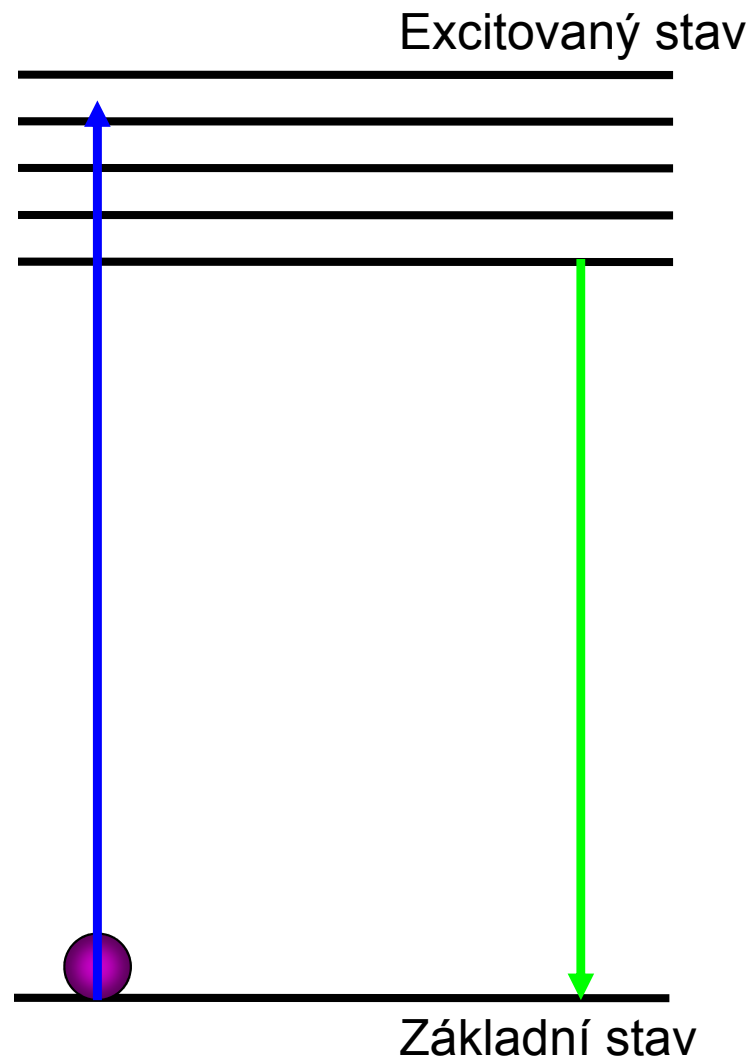


# Fluorescence



- Jablonského diagram

- Aleksander Jabłoński (PL)



**excitace**

Kratší vlnová délka

Vyšší energie

**emise**

Delší vlnová délka,  
méně energie

→ Stokesův posuv



# K čemu je fluorescence dobrá?

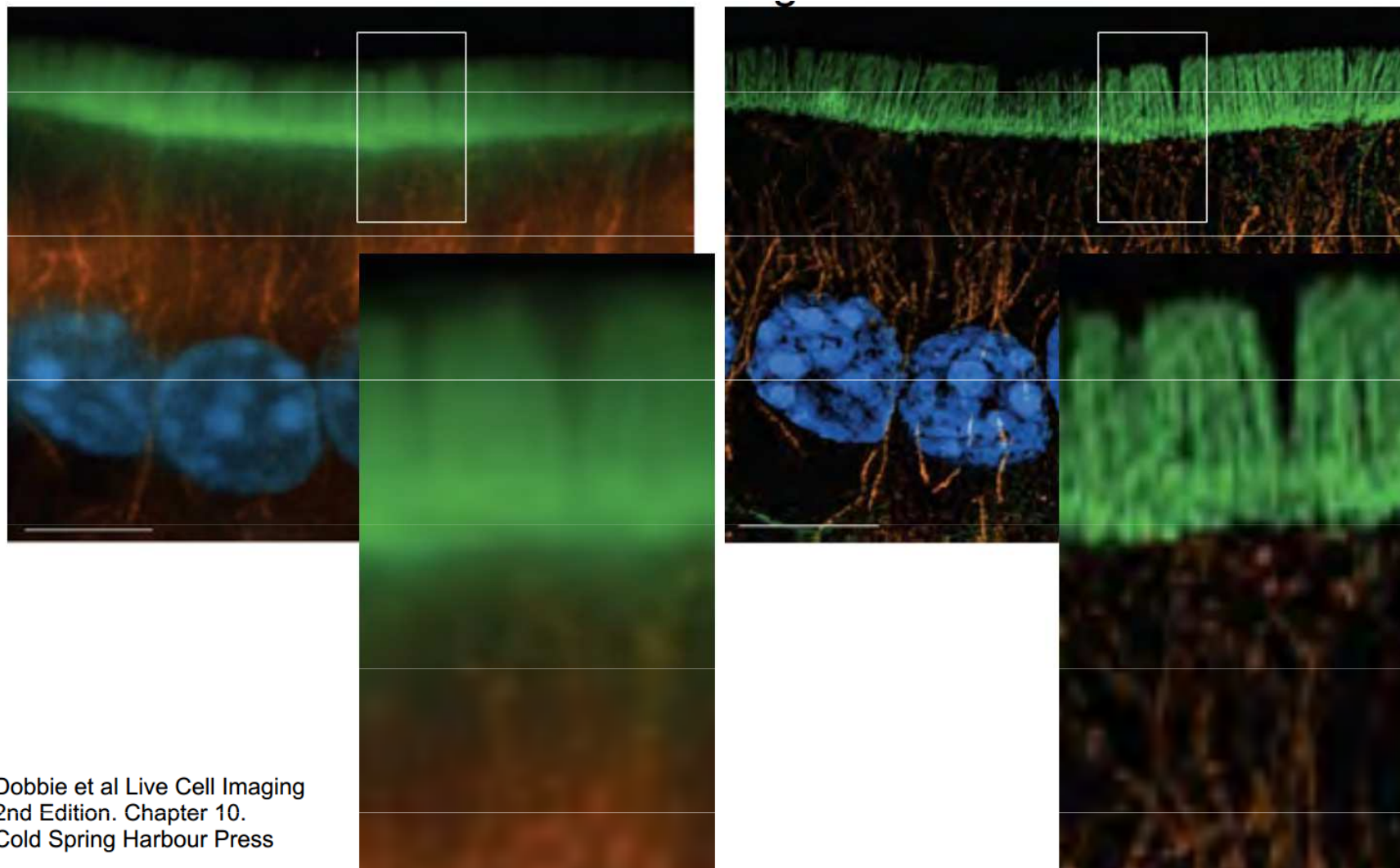
## **Např.:**

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

# 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



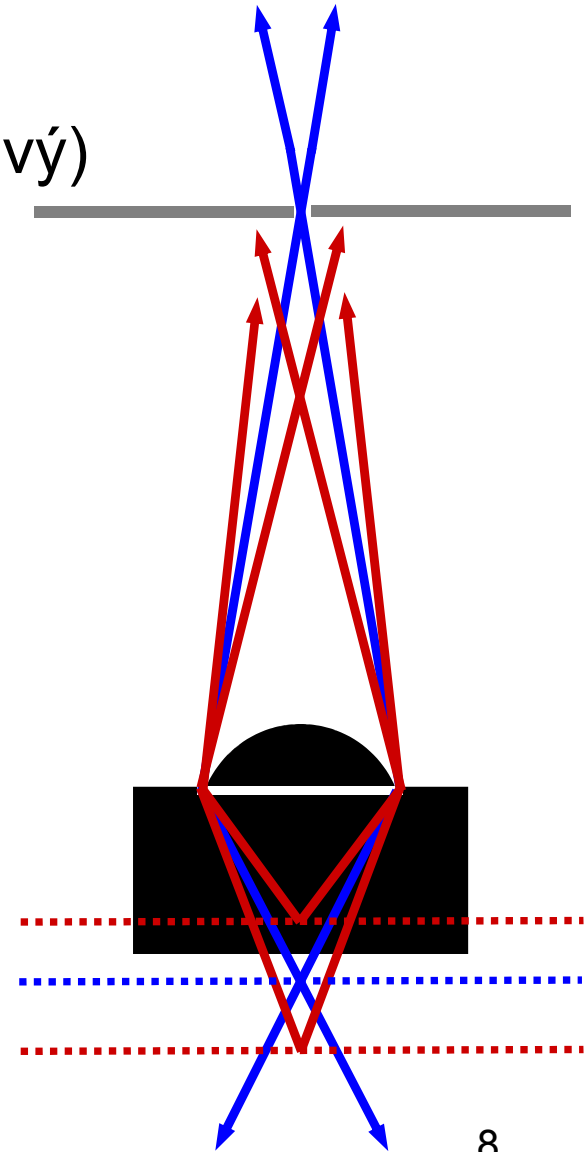
# Konfokální mikroskop

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

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

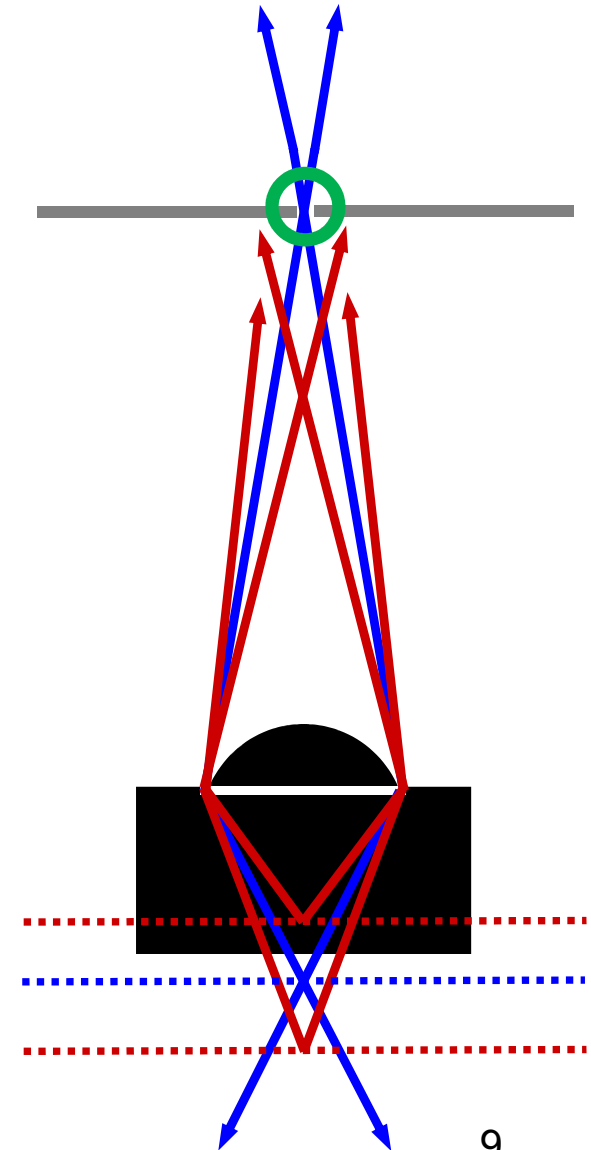
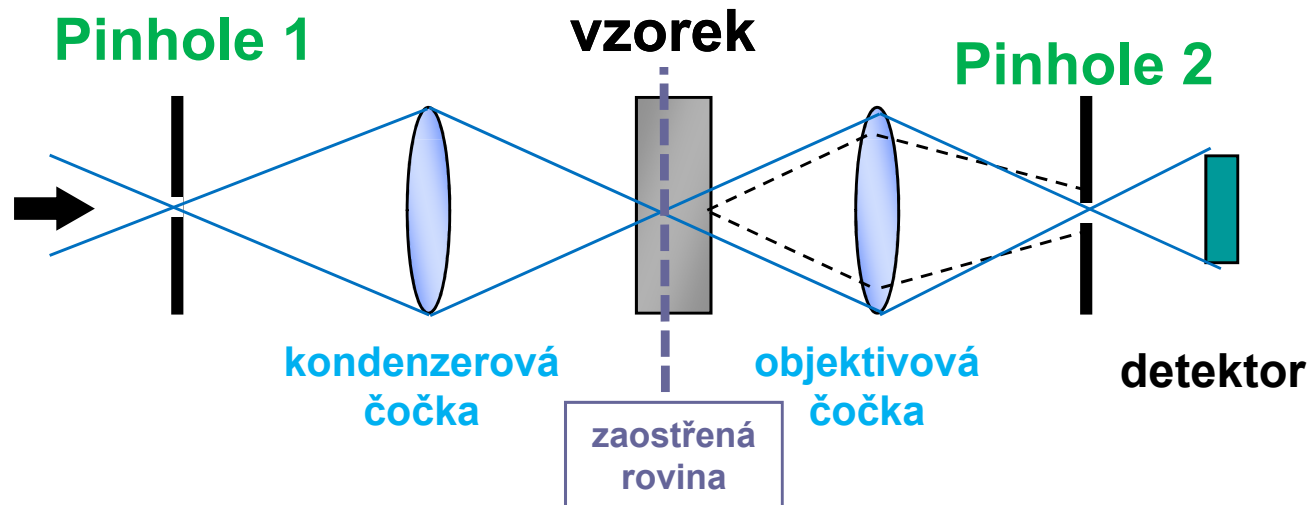
Toho je dosaženo tak, že se zaostří kondenzorové čočky do stejné ohniskové roviny jako čočky objektivu.

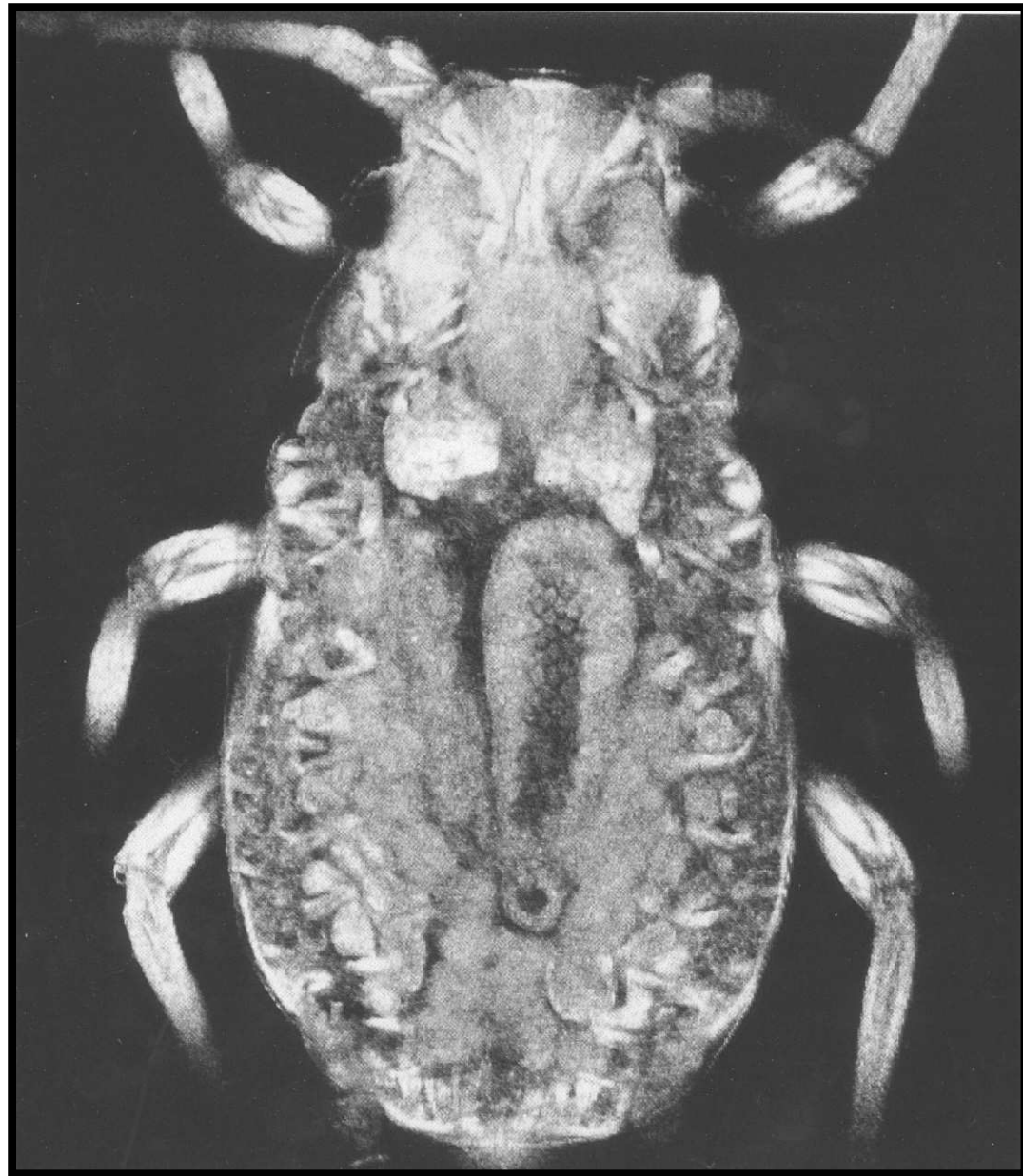
Konfokální mikroskop je druhem optického (fluorescenčního) mikroskopu, jehož výhodou je vyšší rozlišovací schopnost daná detekcí světla pouze z ohniskové roviny mikroskopu.



# Konfokální mikroskop

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

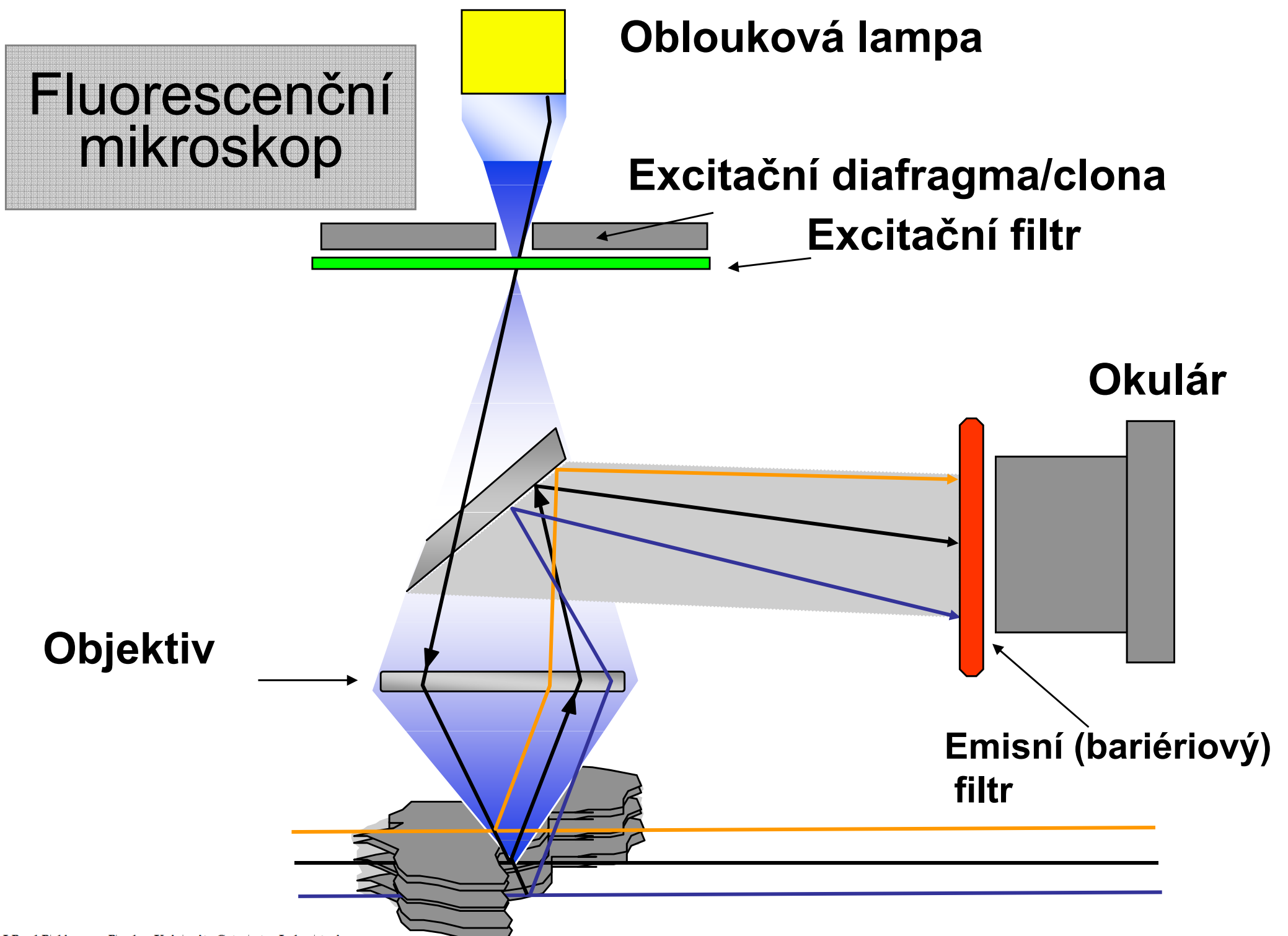




# optický řez

- mšice





# Konfokální princip

Laser

Excitační pinhole

Excitační filtr

dělič paprsků a  
rastrovací zařízení

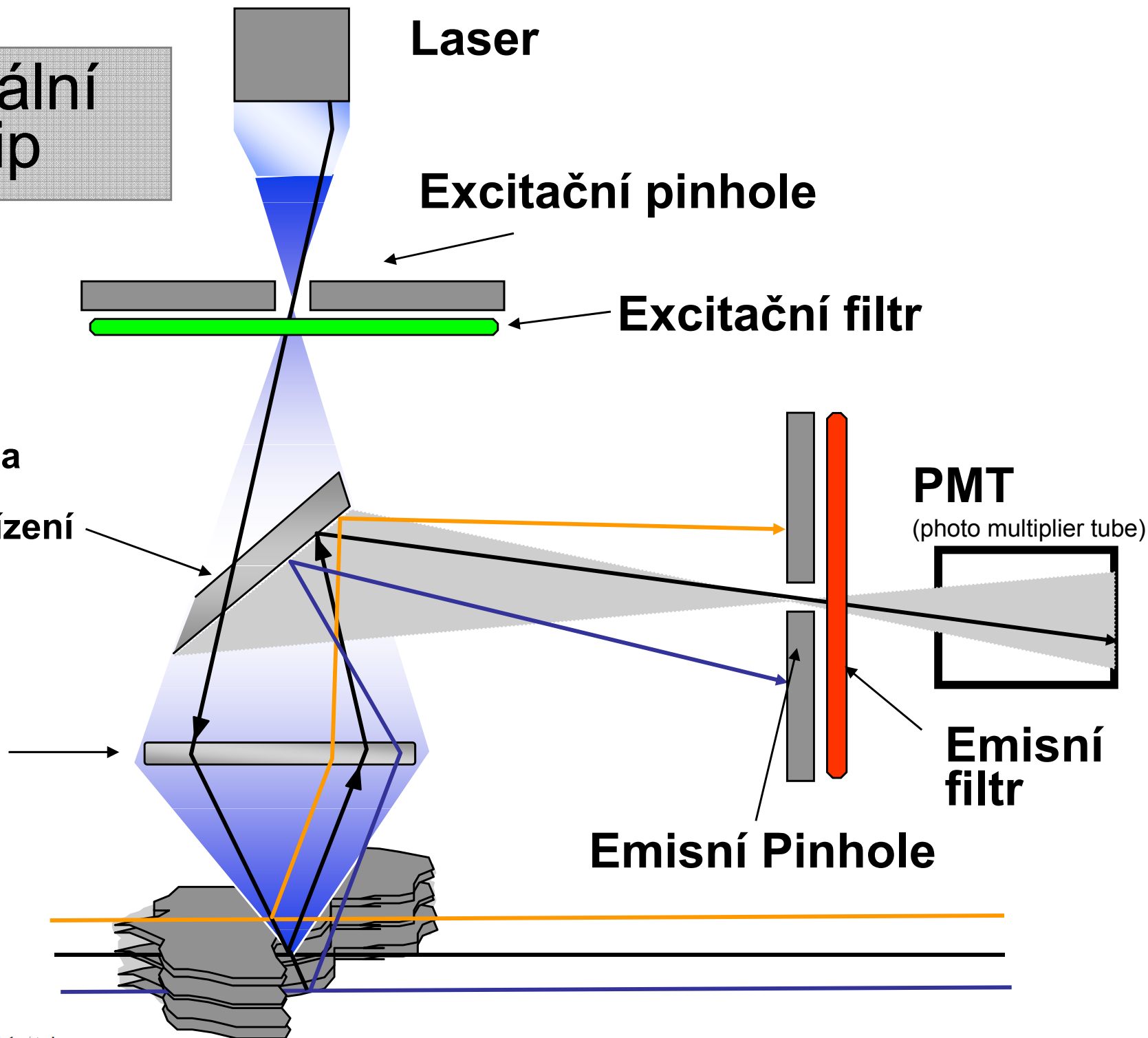
Objektiv

PMT

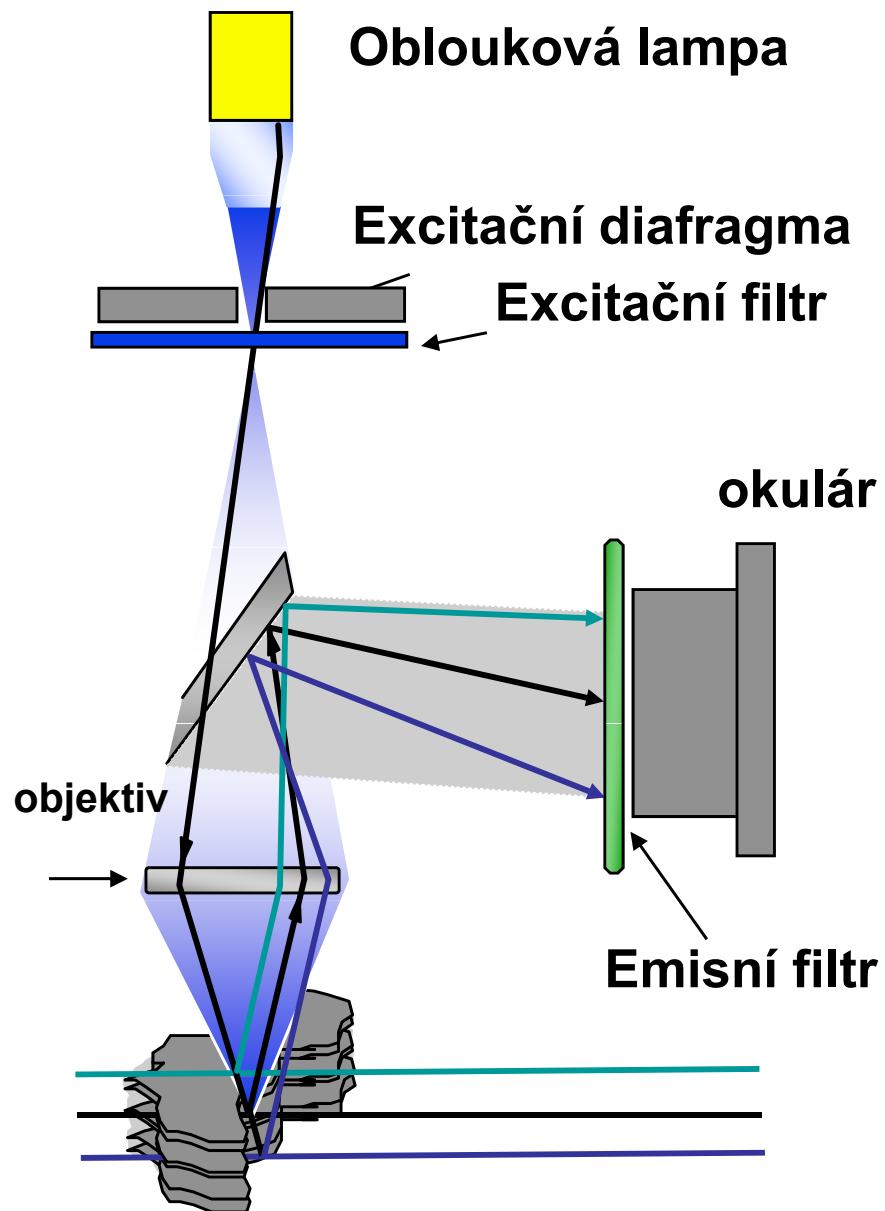
(photo multiplier tube)

Emisní  
filtr

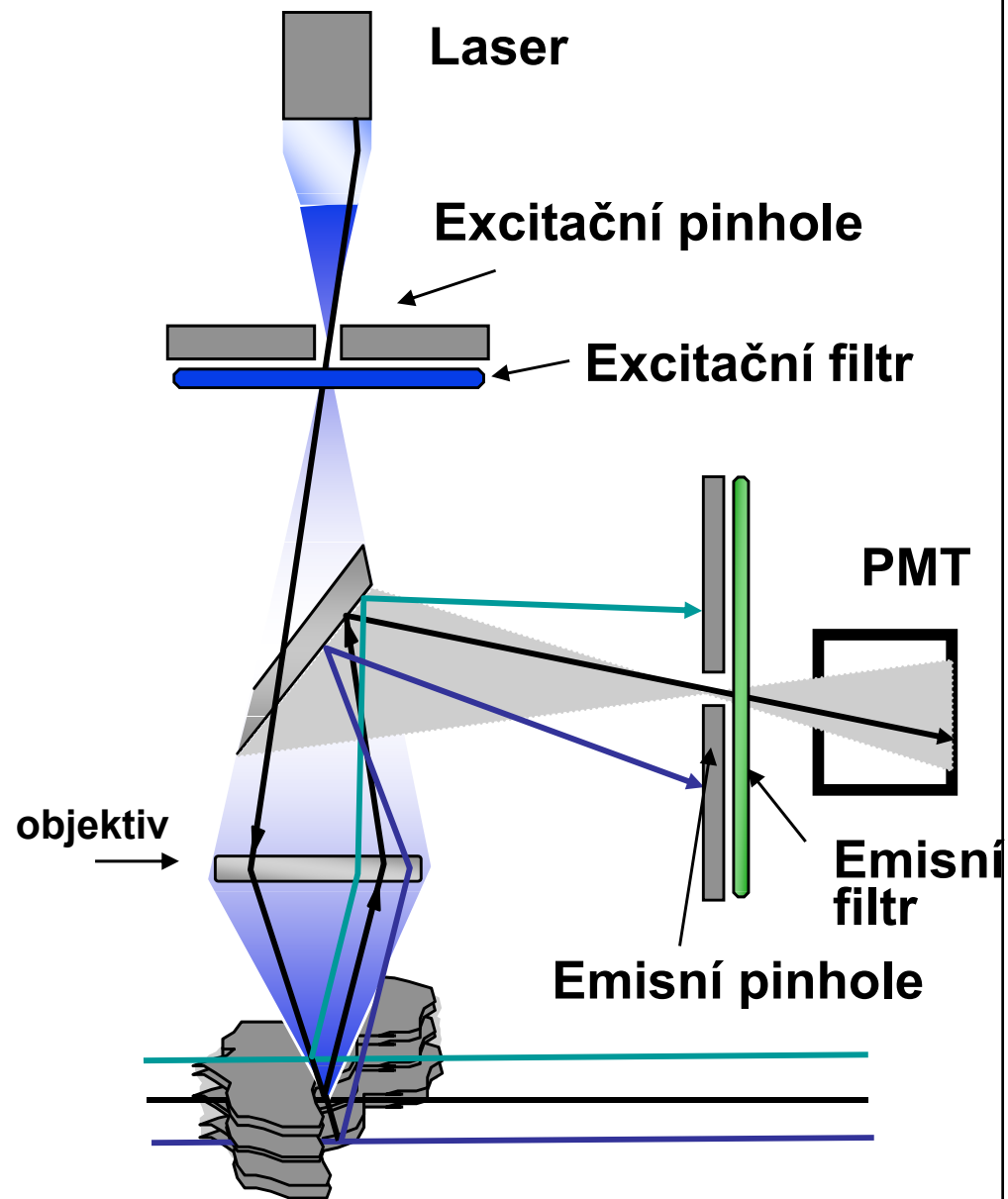
Emisní Pinhole



## Fluorescenční mikroskop



## Konfokální mikroskop



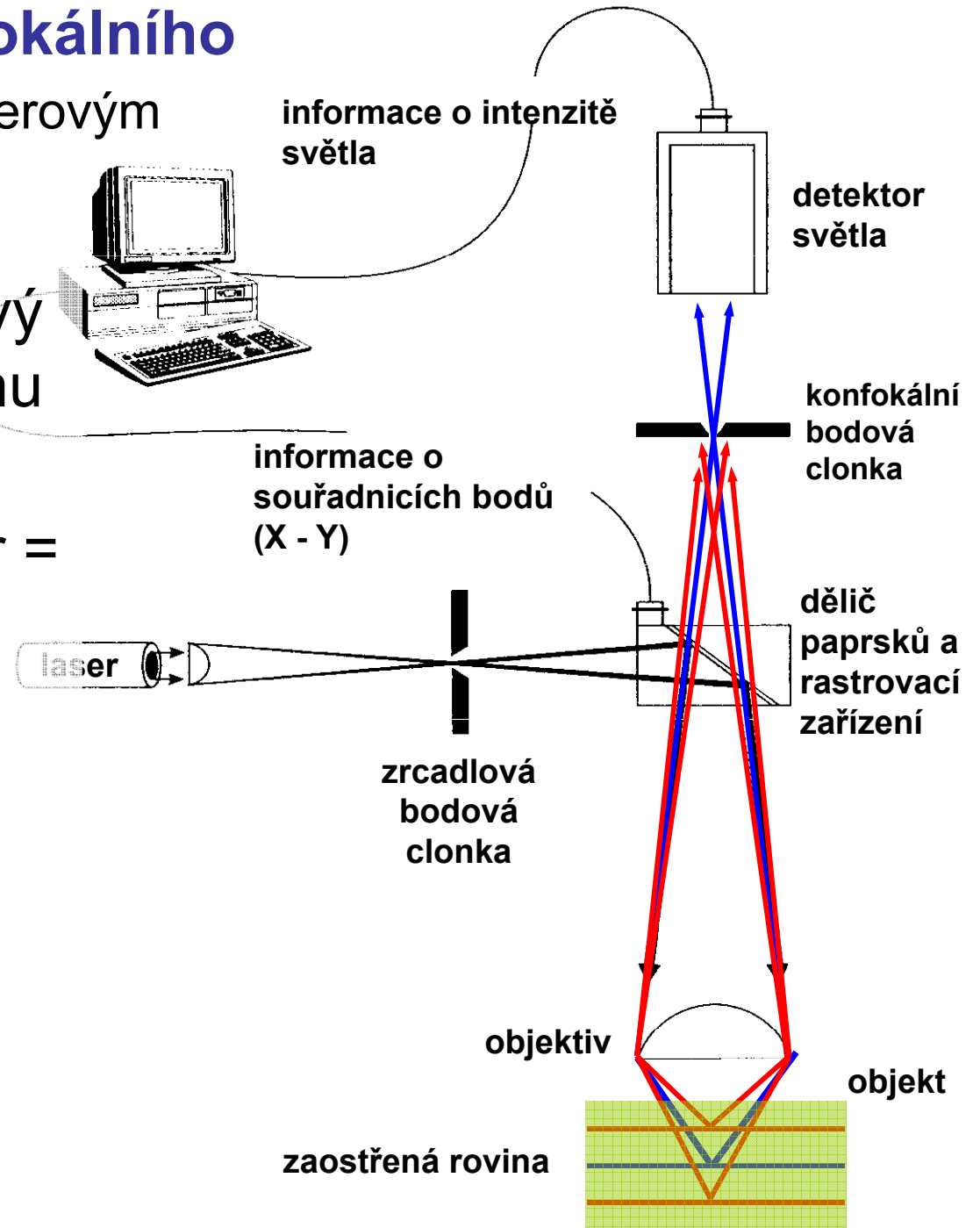


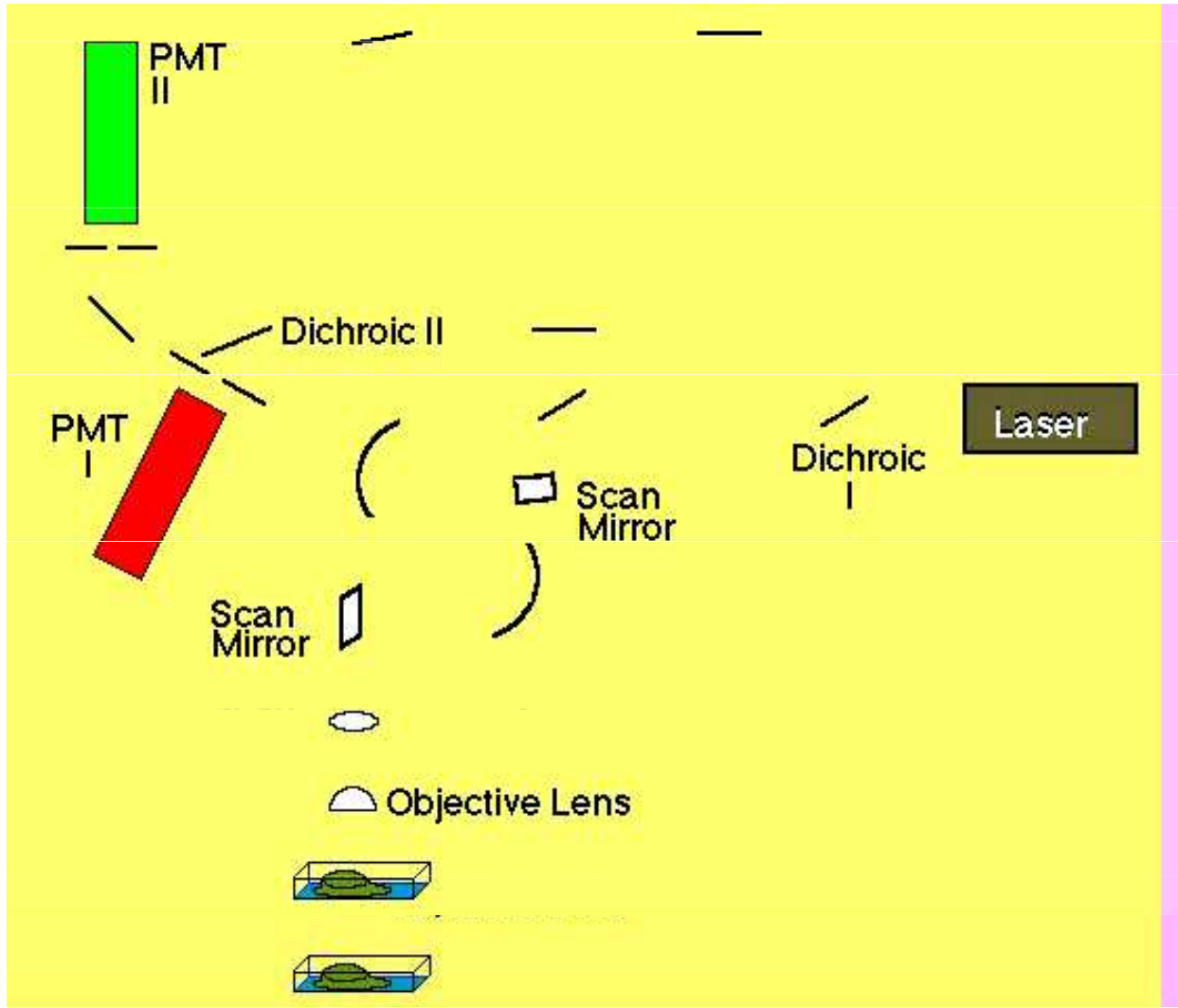
# Výhody konfokální mikroskopie

- **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)

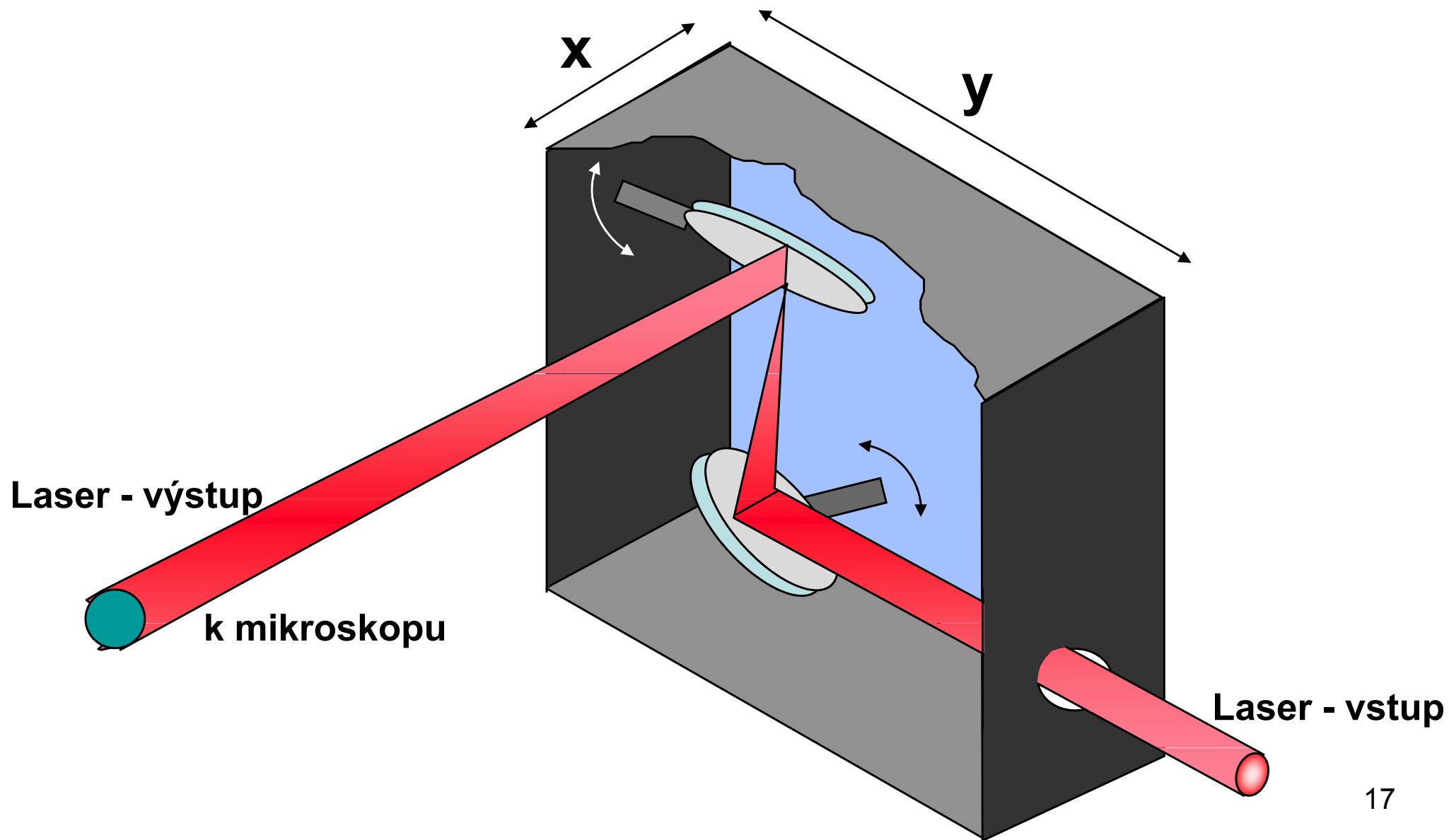
- Bodový zdroj světla: laserový paprsek fokusovaný na clonu
- Clona je objektivem zobrazena do bodu (průměr = rozlišovací schopnosti objektivu)
- Objektiv sbírá světlo odražené a rozptýlené – zpětný průchod objektivem: obraz bodové clonky
- Druhá konfokální bodová clonka (blokuje nezaostřené roviny)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







# Bodové skenování



# Olympus Fluoview 500

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



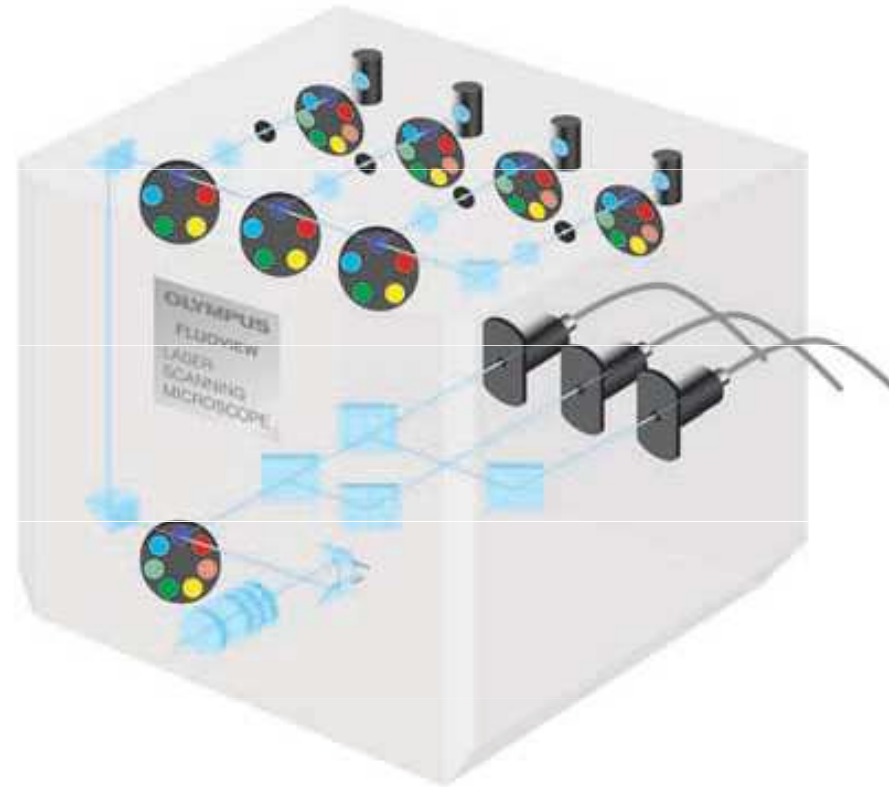
# Olympus Fluoview 500

- 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:

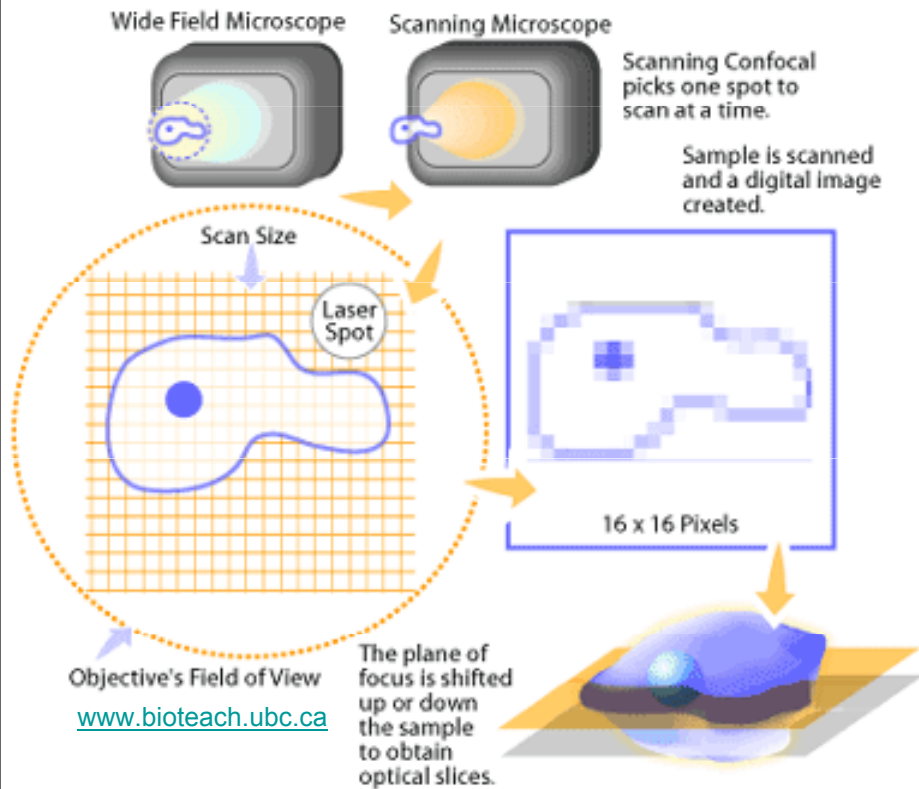
<http://www.olympusfluoview.com/brochures/pdfs/fluoview.pdf>

# Olympus Fluoview 500



Stavba – str. 4:

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

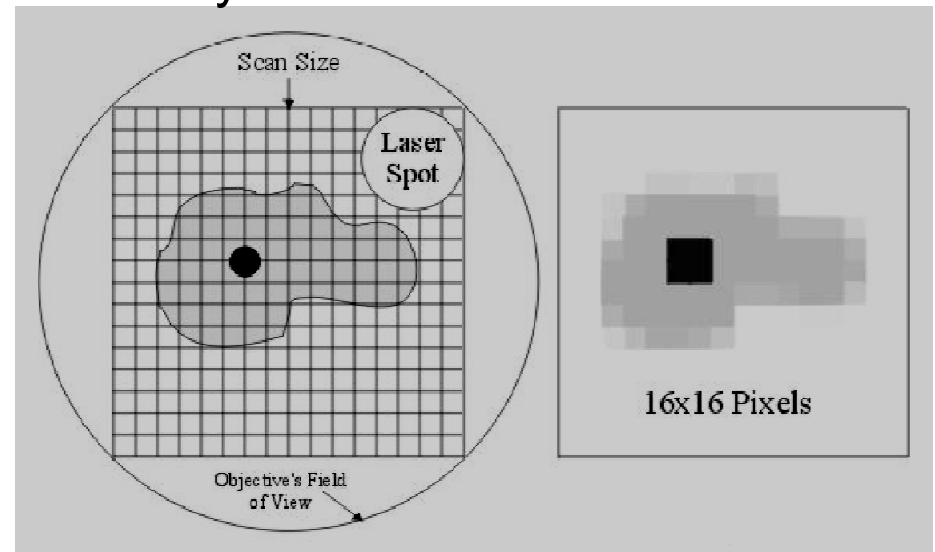


- netvoří obraz vcelku, ale bod po bodu, řádkováním
- pomocí řádkování jsou snímány optické body v rovině XY i jednotlivé optické řezy v ose Z díky definovanému posuvu objektivu
- konfokální obrazy jsou zaostřené a představují jednotlivé optické řezy vzorkem
- složení trojrozměrných obrazů vychází z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

# Rastrování

## typy mikroskopu:

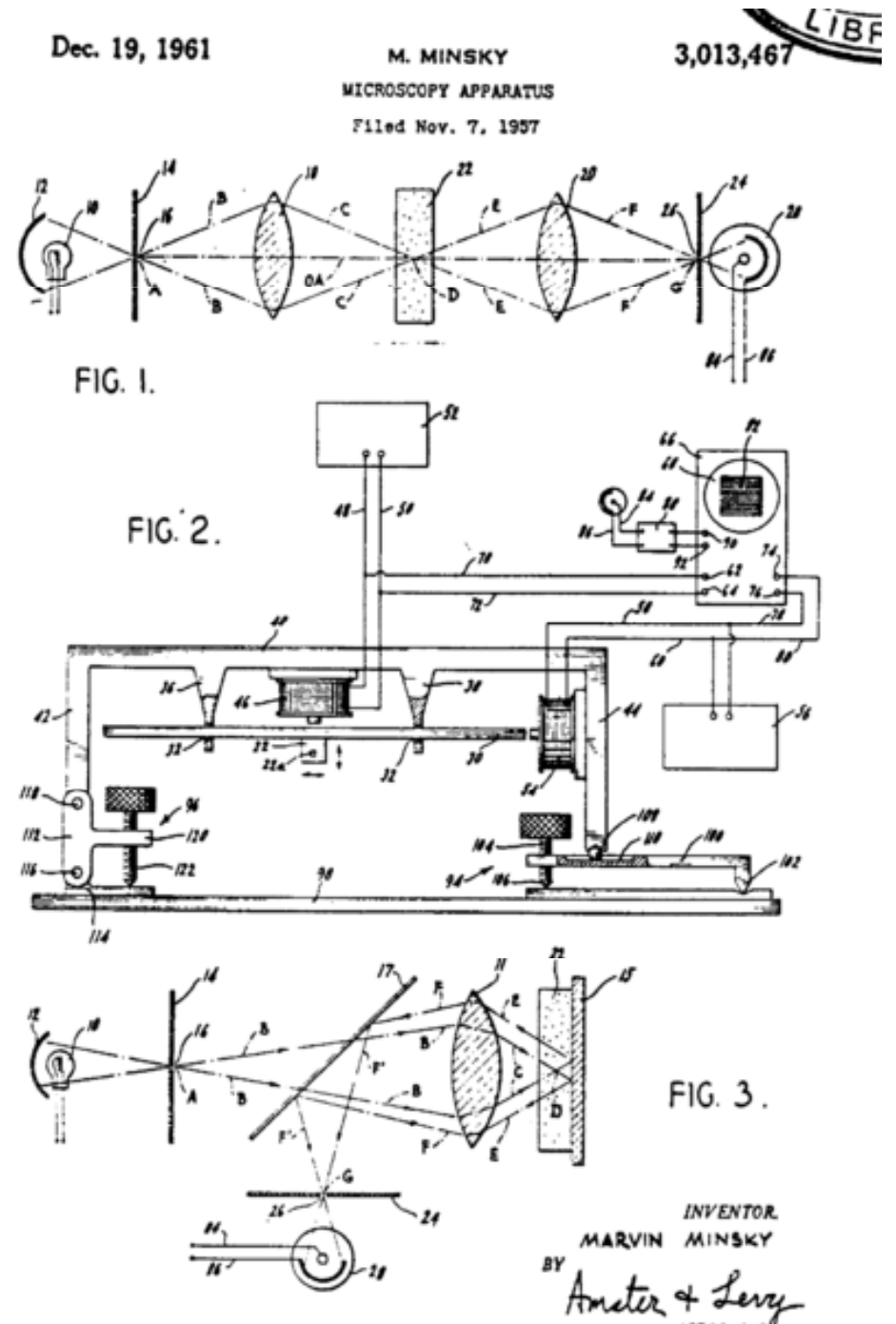
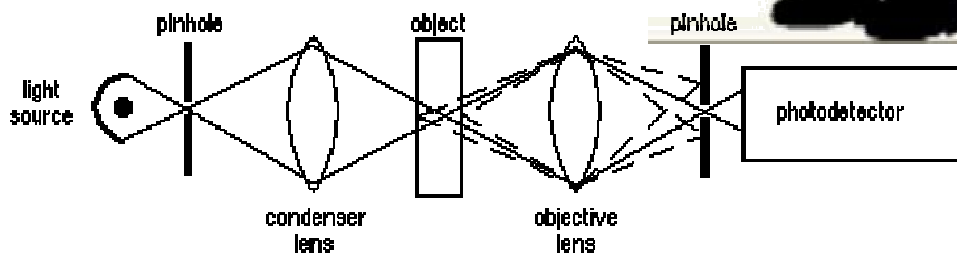
- rastrující konfokální mikroskop - skenující zařízení zařizuje posun ohniska excitujícího laserového paprsku
- konfokální mikroskop s rotujícím diskem - místo skenujícího zařízení obsahuje rotující Nipkowův kotouč, na kterém je mnoho navzájem oddělených clonek





# Historie

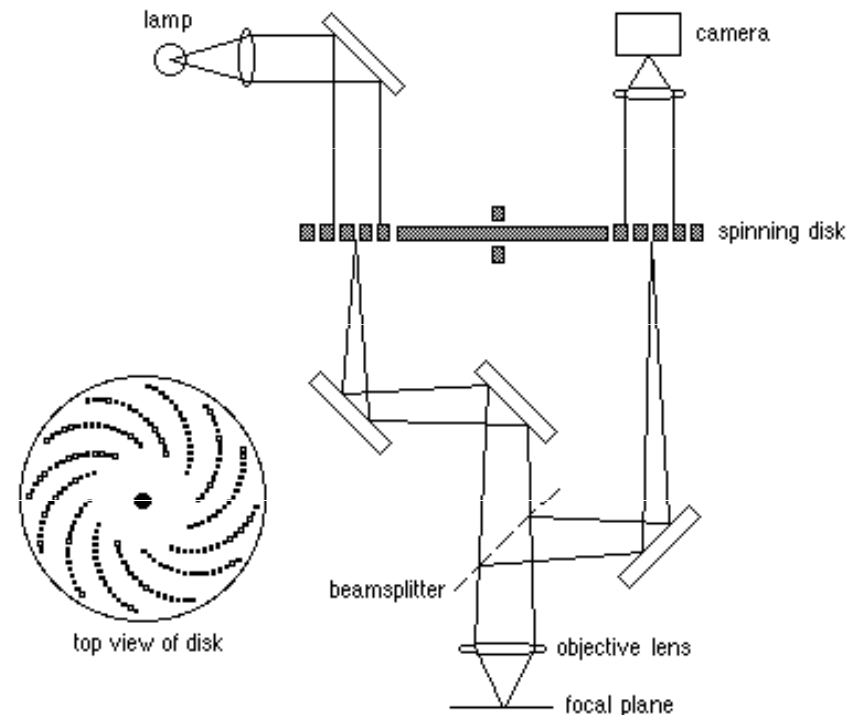
- Marvin Minský
- 1957 – patent
- neměl vhodný zdroj světla





# Historie

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

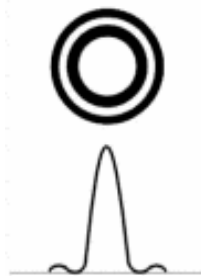


<http://www.currentprotocols.com/protocol/cy0208>

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.

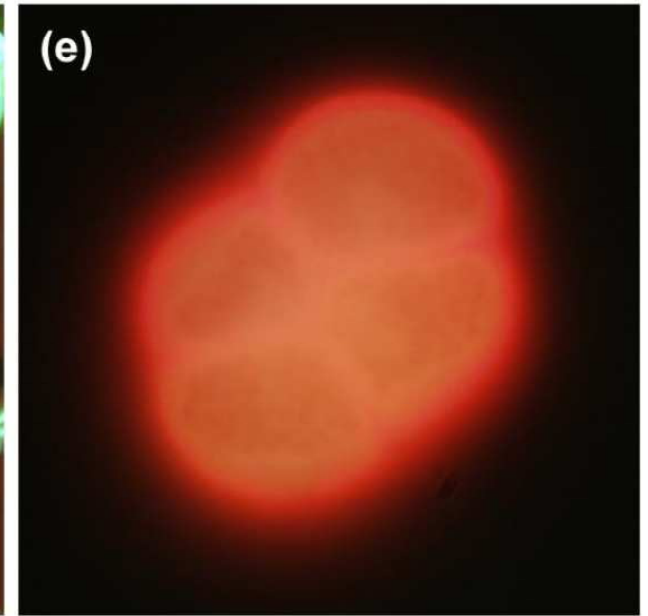
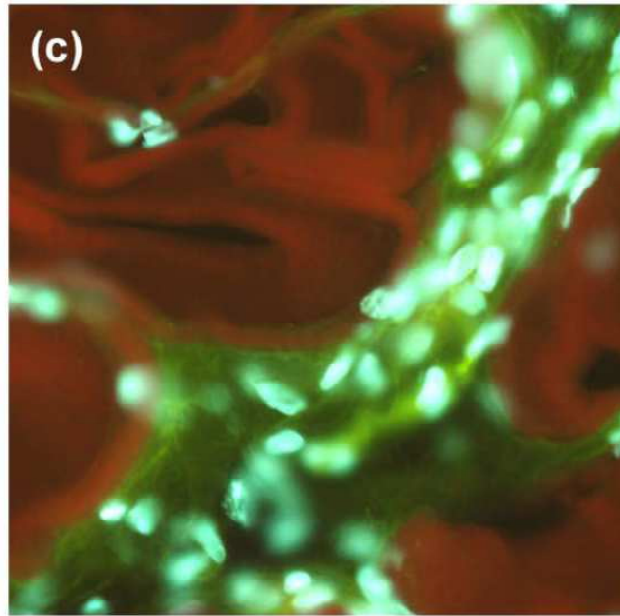
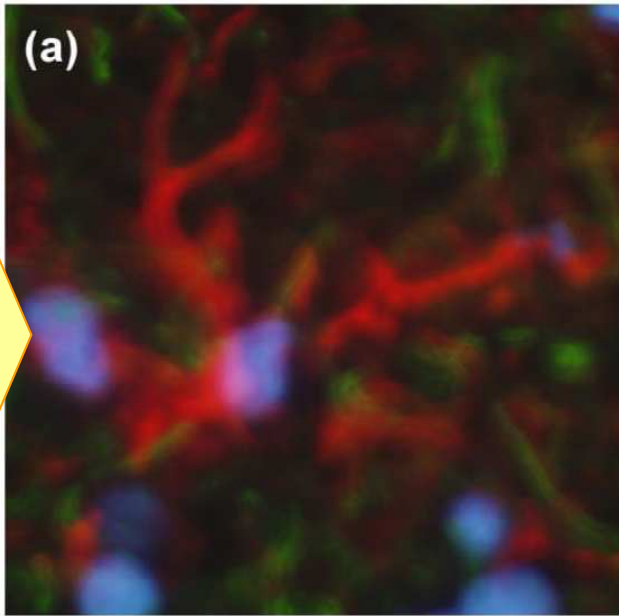
- Předpoklad malé tloušťky preparátu
- Silné vzorky – překrývání obrazu zaostřené roviny nezaostřenými (nad i pod)
- Vzorky o tloušťce menší než je hloubka ostrosti objektivu (závisí na numerické apertuře)
- obrazem ne bod, ale Airyho kroužky



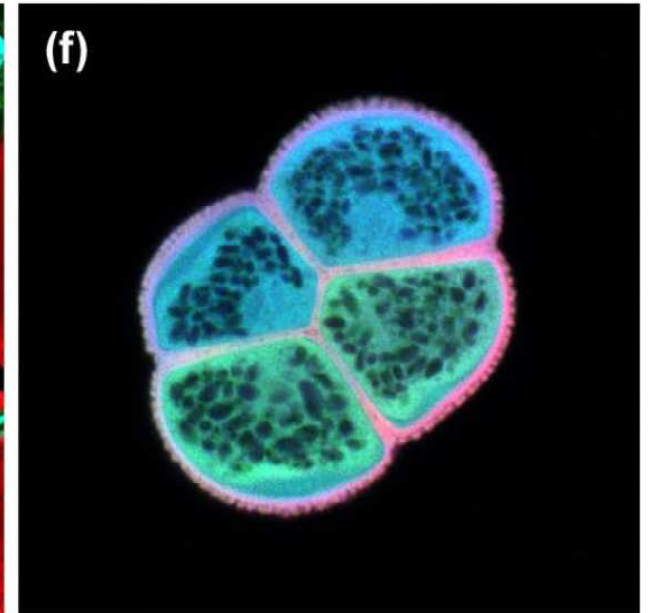
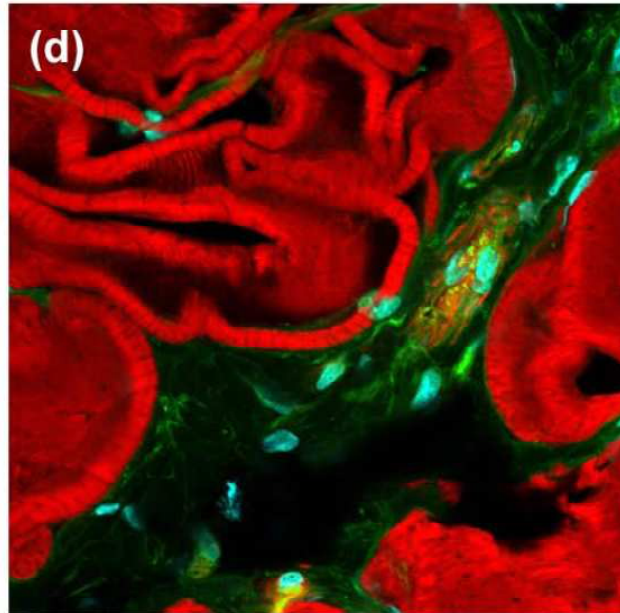
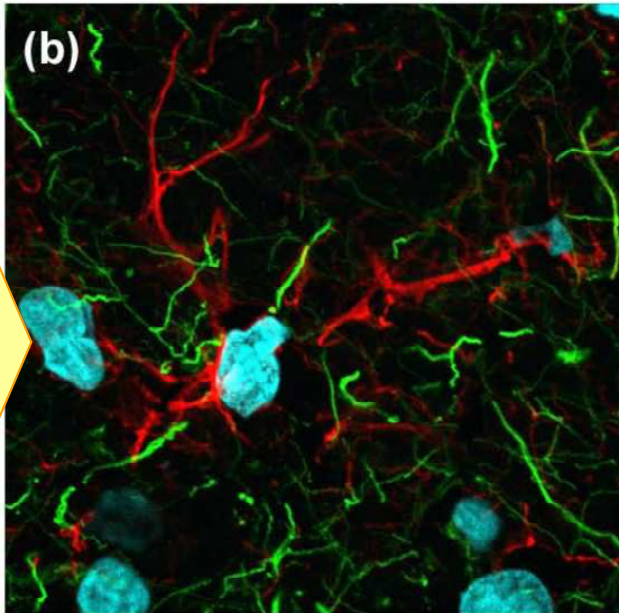
# Konfok. Mik.

- 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



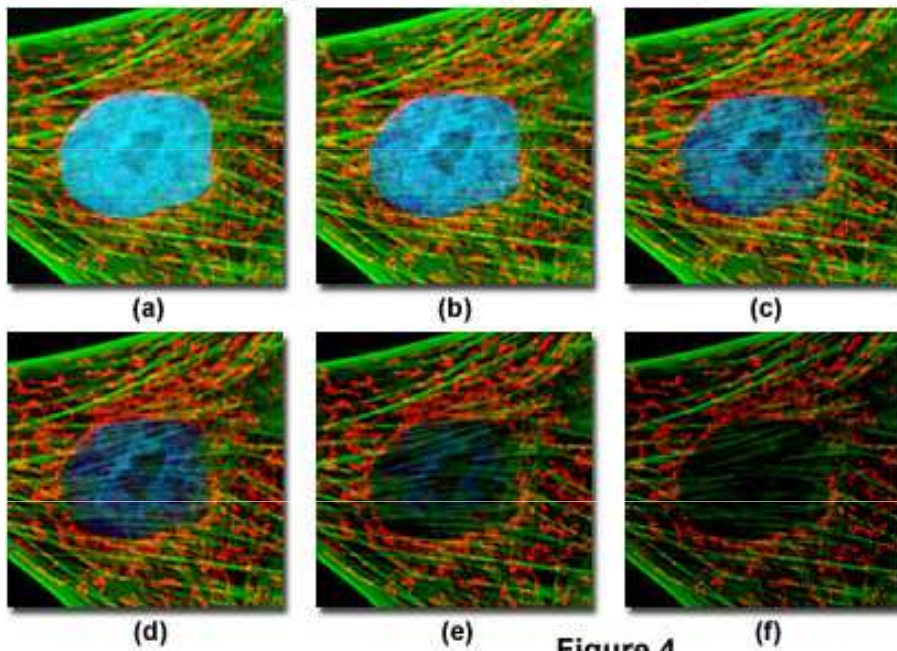
- odstranění mimoohniskových rovin
- vysoký kontrast obrazu
- neinvazní metoda
- zachování prostorového uspořádání
- schopnost vytvoření prostorové rekonstrukce
- digitální forma výstupu - rotace, perspektiva, ...
- schopnost zobrazení buňky - tkáně - mnohobuněčného organismu
- současné použití až 4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



Differential Photobleaching in Multiply-Stained Tissues

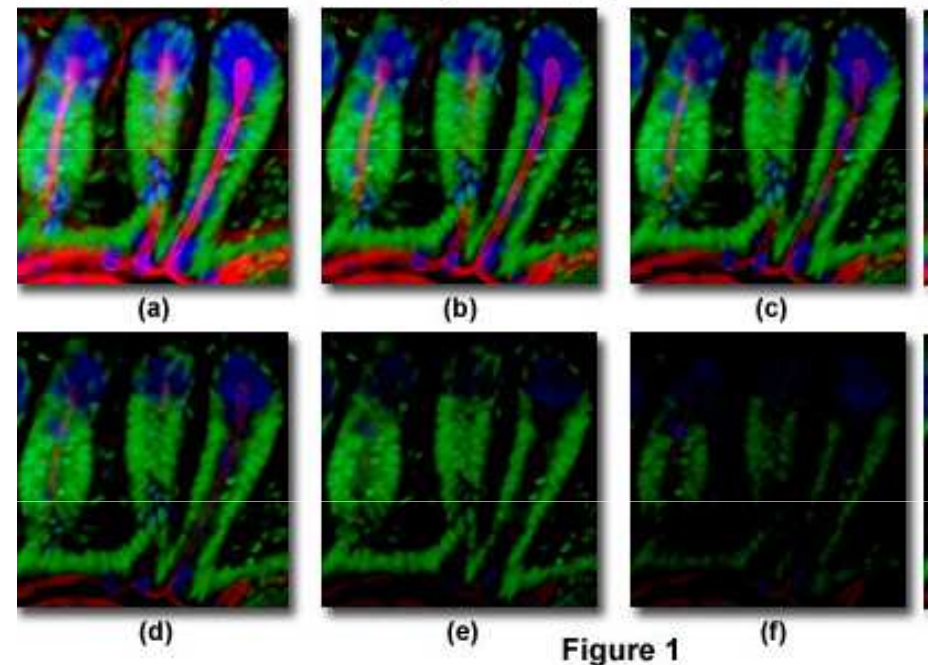
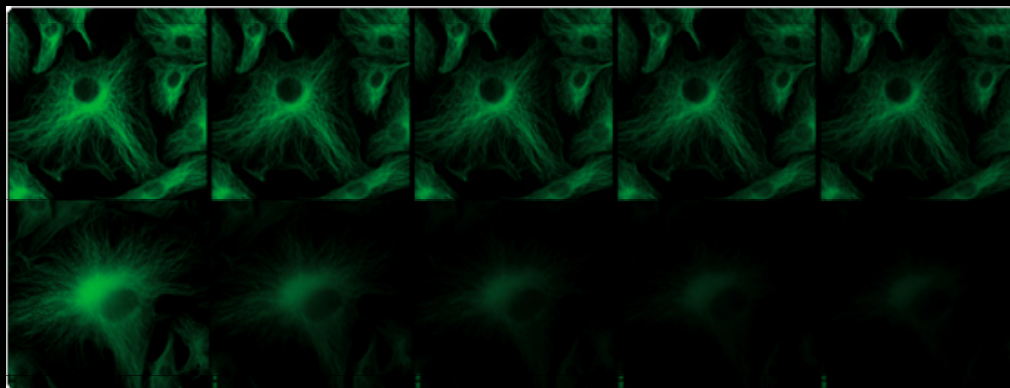


Figure 4

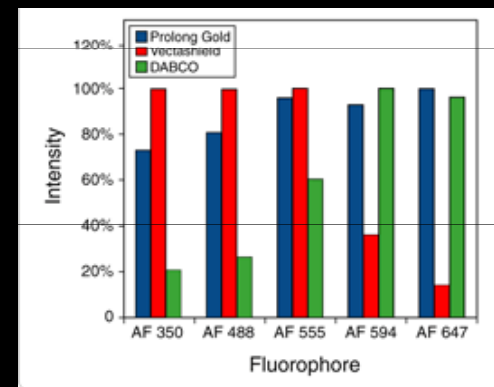
Figure 1

Before bleaching

After bleaching

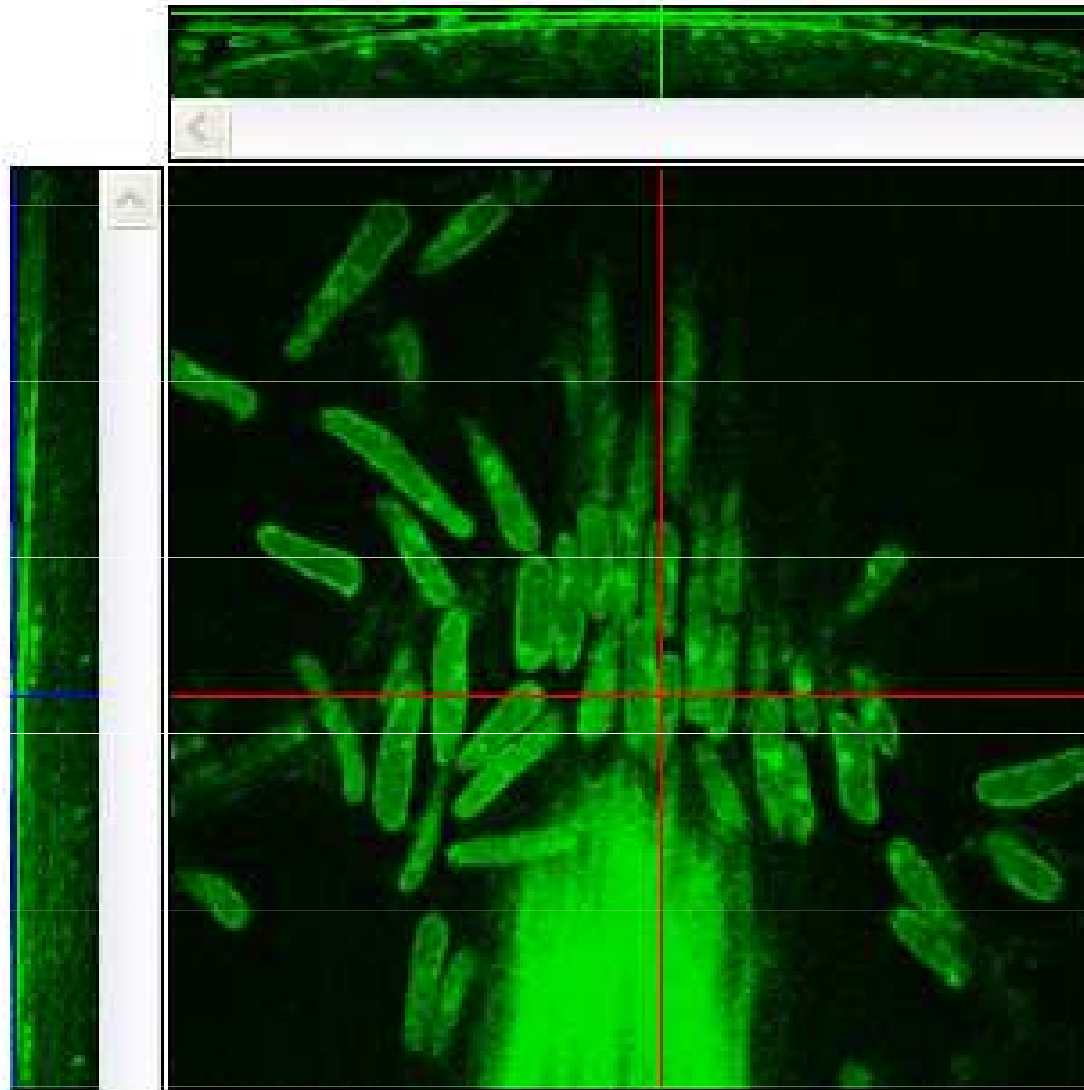


← ProLong® Gold antifade reagent



- Prolong Gold
- Vectashield
- DABCO

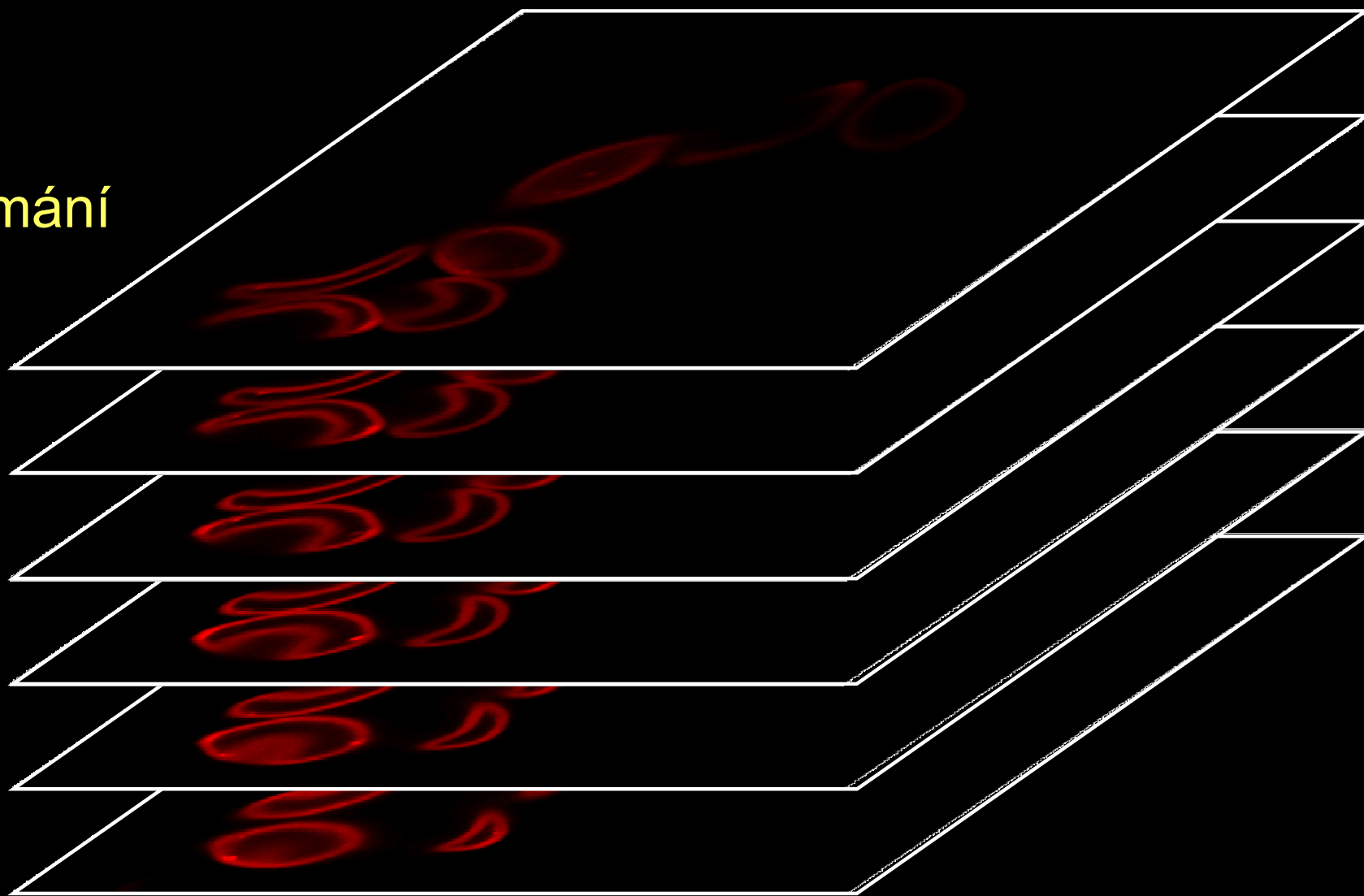


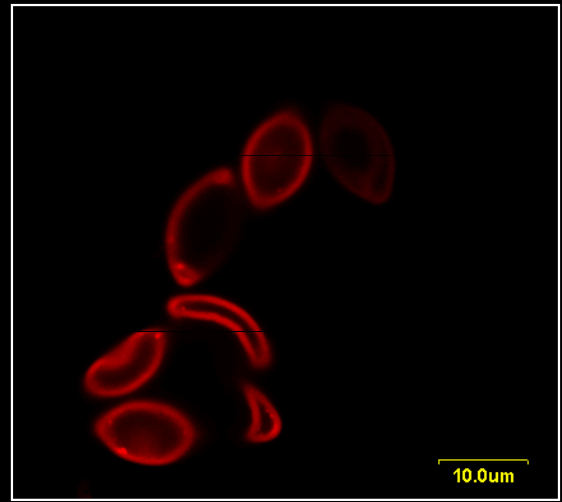
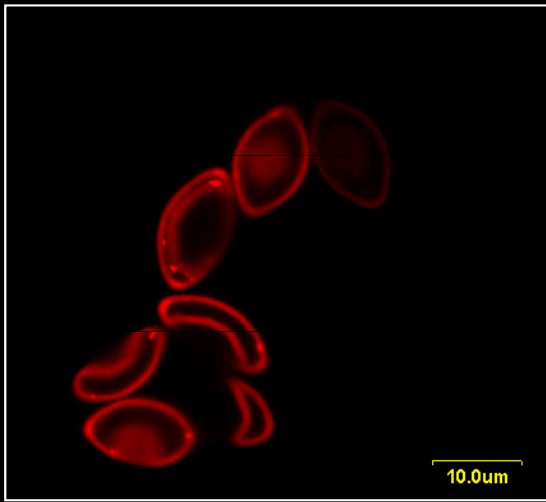
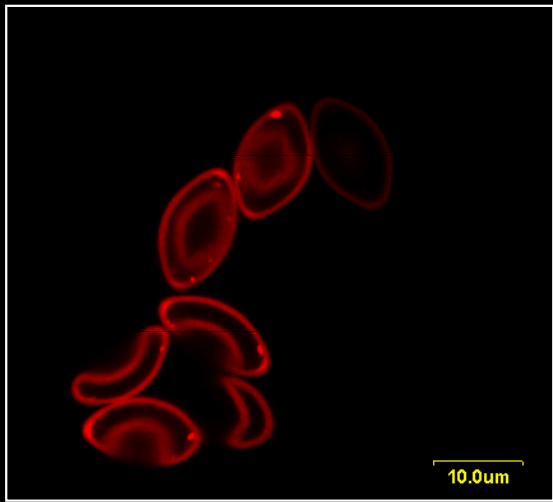
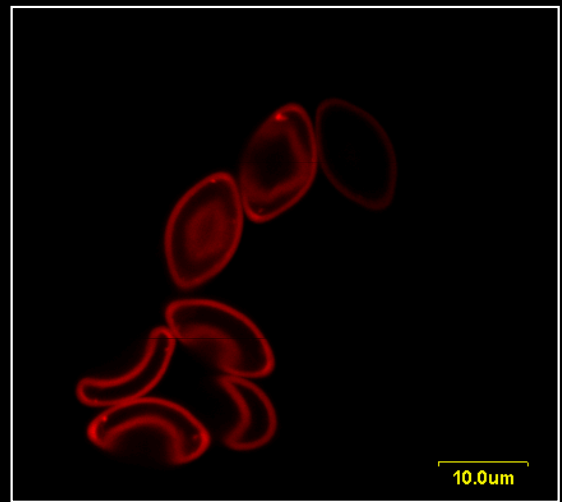
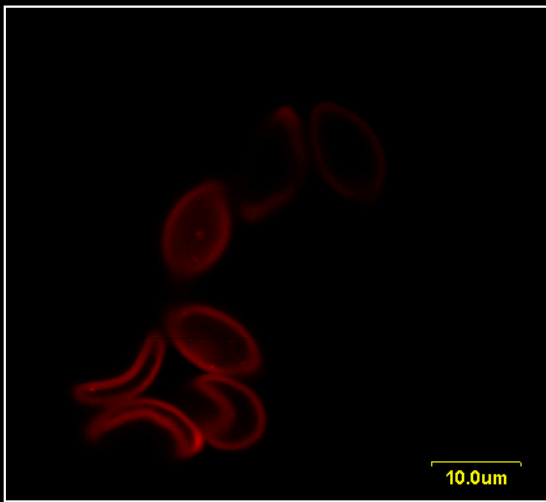
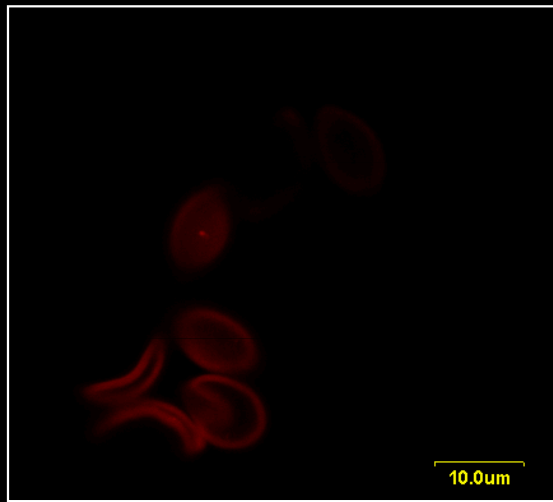


XZ slice  
along this line

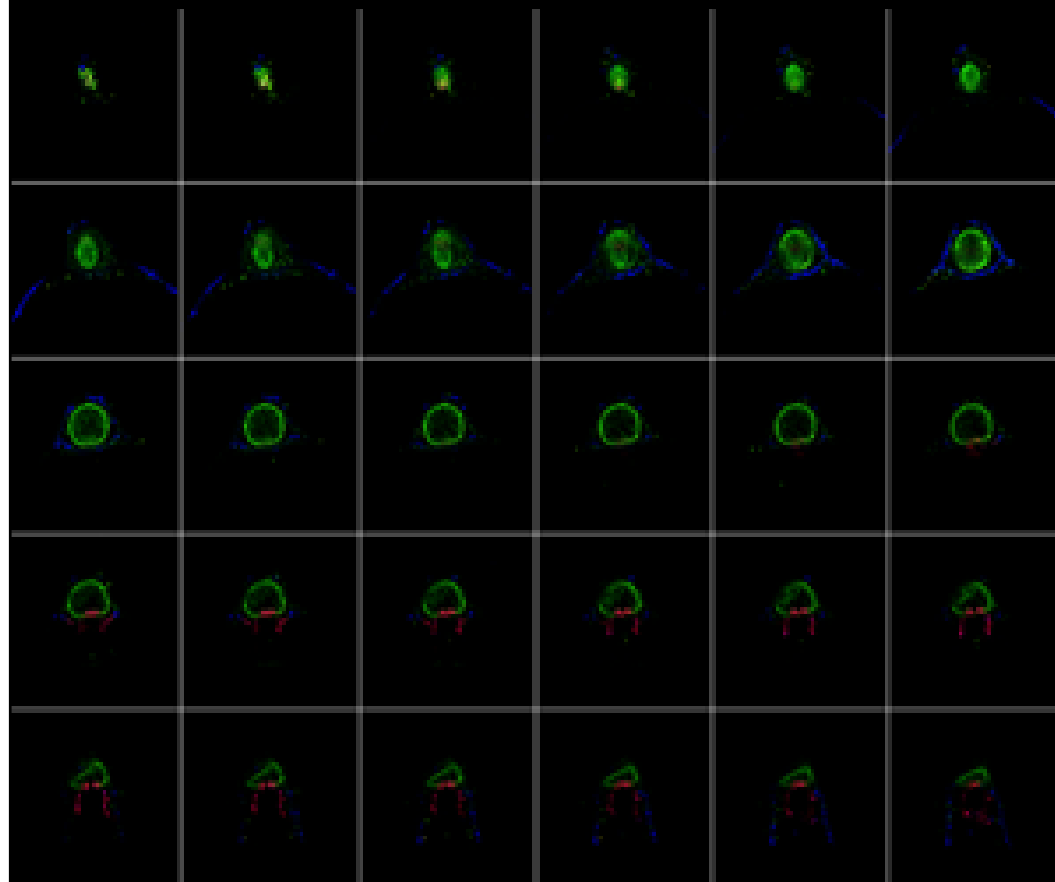
YZ slice  
along this line

směr snímání

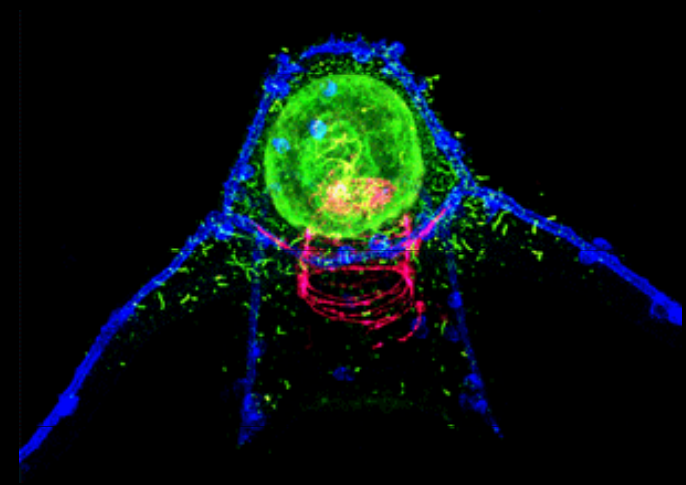
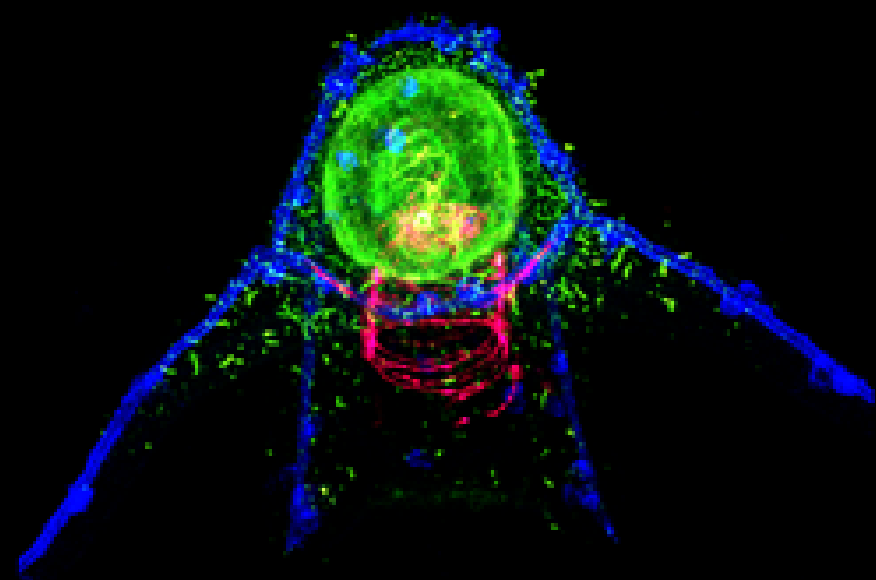




Gallery view of 3 color Z-stack

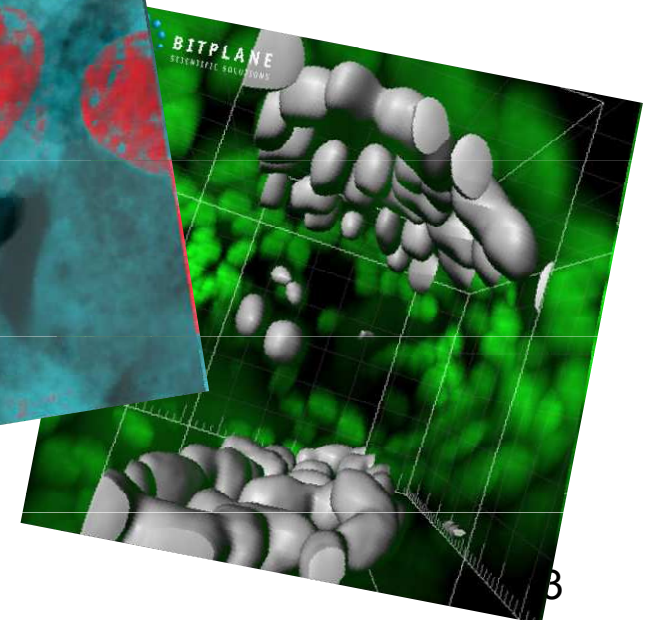
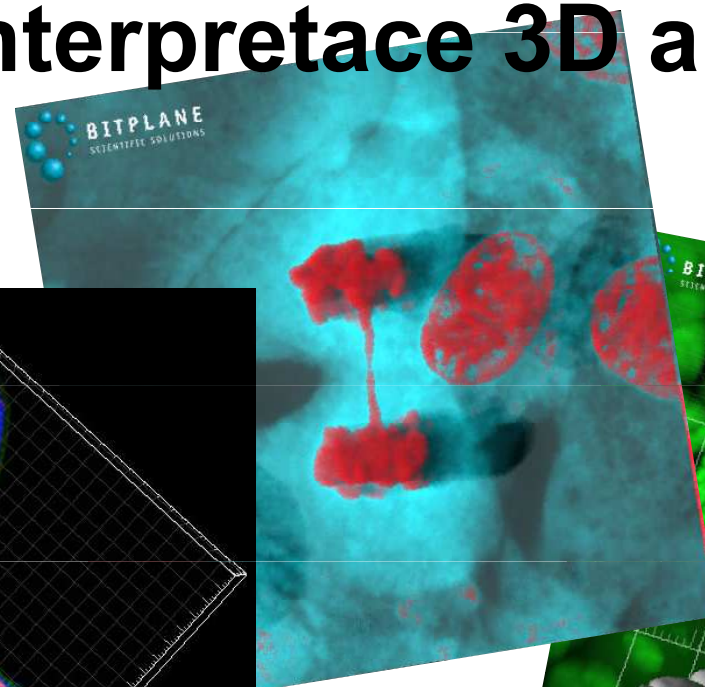
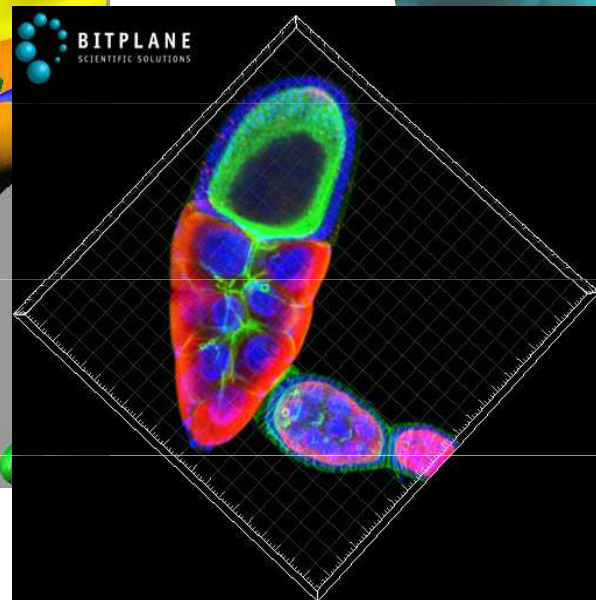
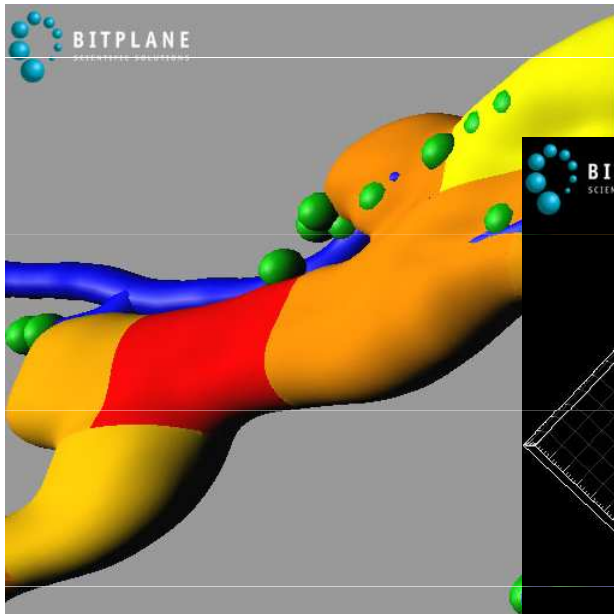
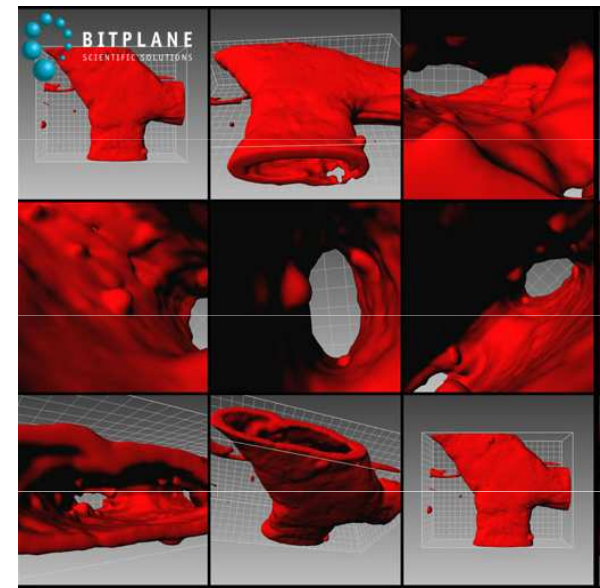


Maximum Intensity Projection



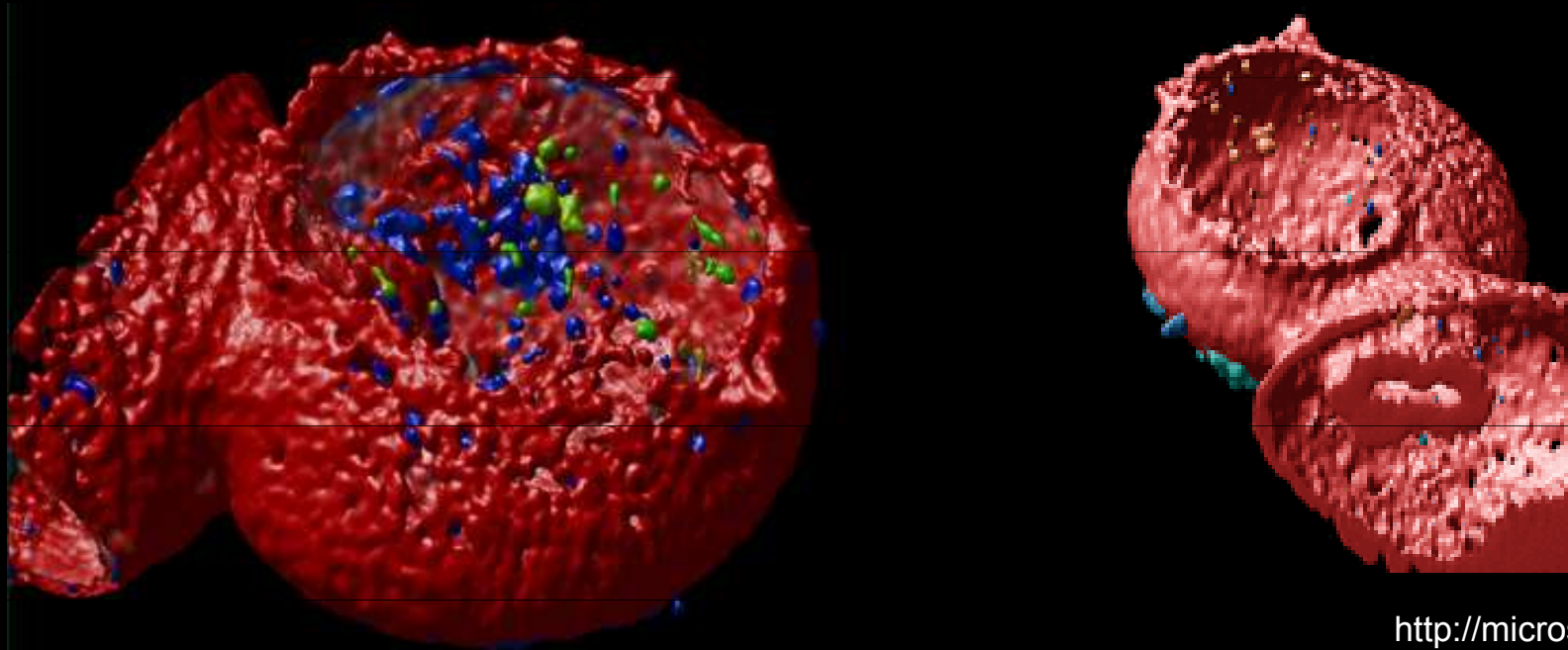
# Imaris

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

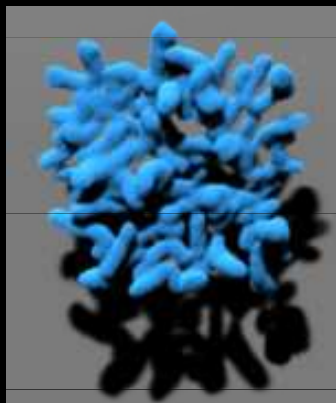


# Další programy:

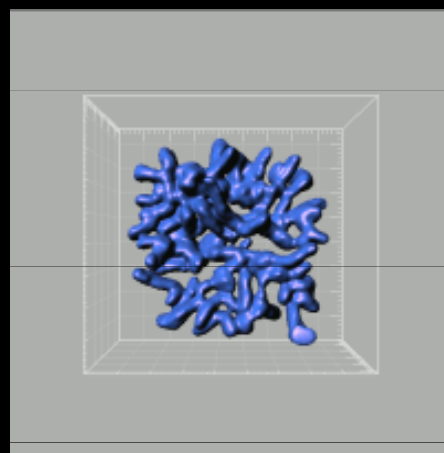
Leica LAS software, ImageJ, MetaMorph and Huygens



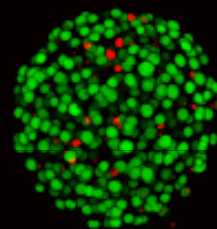
<http://microscopy.duke.edu/3D/>



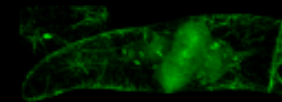
**Metaphase :**  
LSM510 3D  
module (Zeiss)



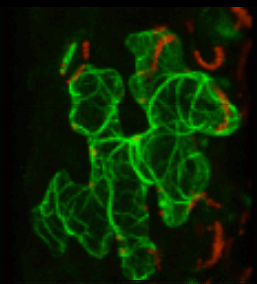
**Metaphase**  
Imaris software Bitplane



**neurokapsule**  
Imaris software  
Bitplane



**Tabák. b. v telofázi**  
Imaris software  
Bitplane

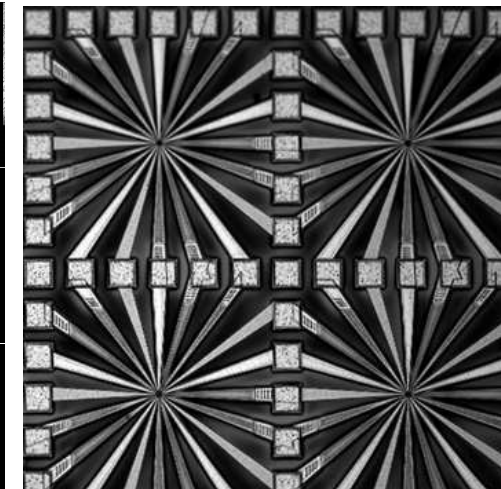
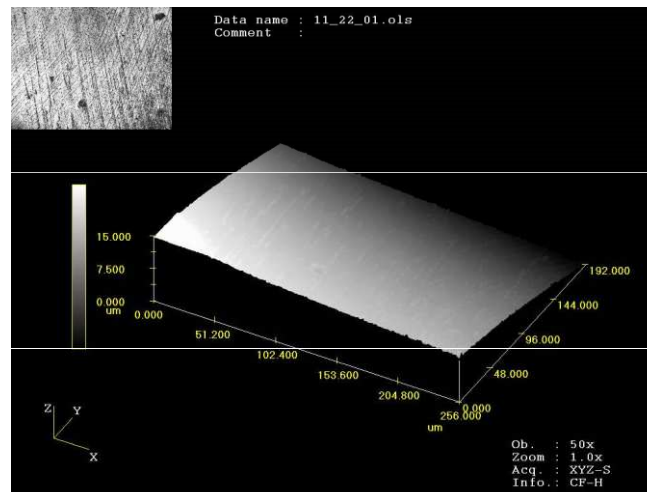
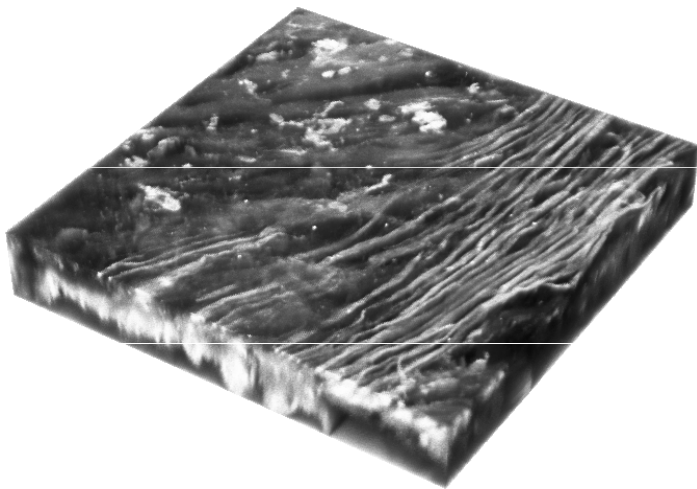


**Cytoskelet a  
chloroplasty  
tabáku**  
LSM510 3D  
module (Zeiss)

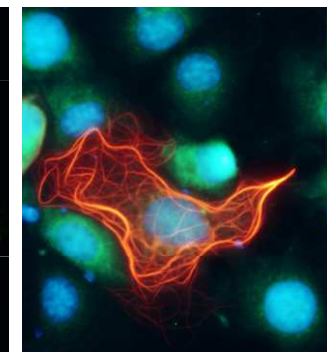
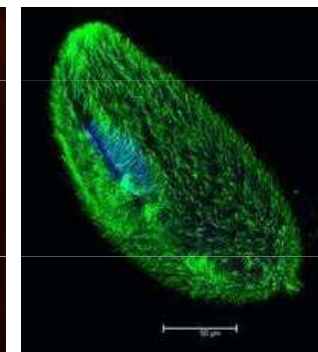
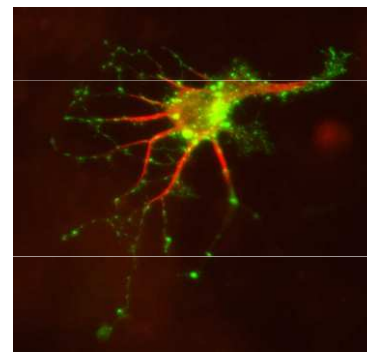


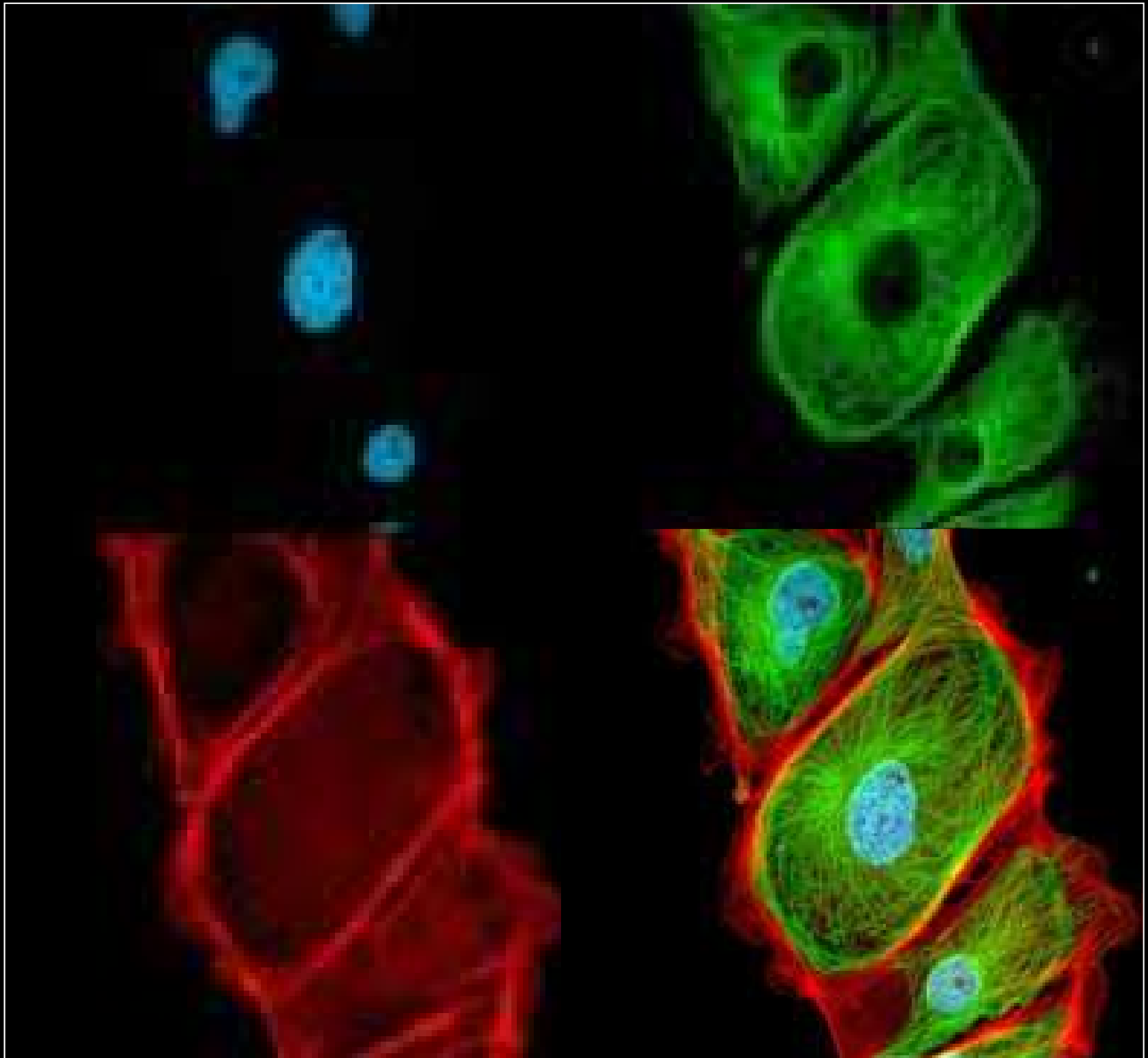
# Využití světla pro CLSM

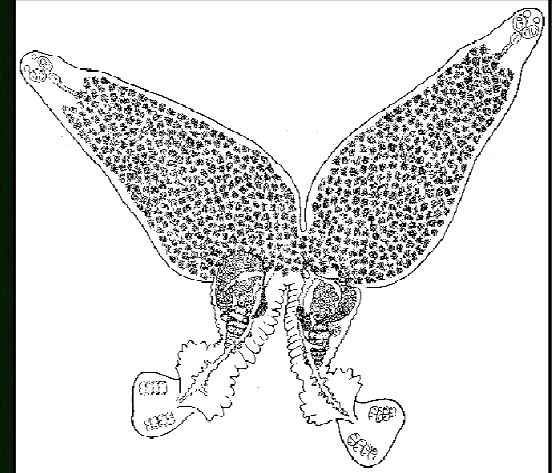
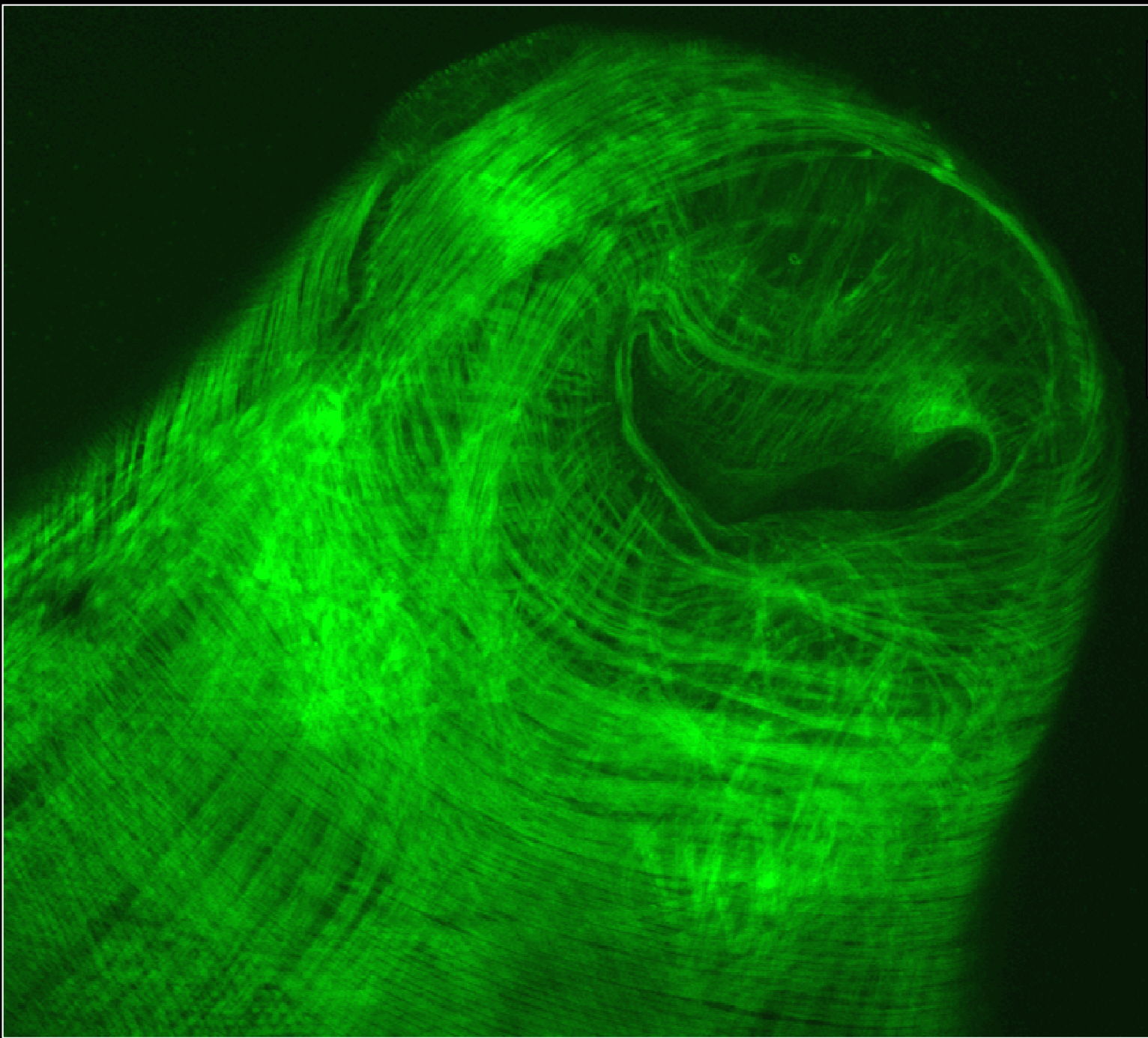
- reflexe - textura a složení povrchů - elektronických součástek, studium neuronových sítí (pomocí Ag), ...



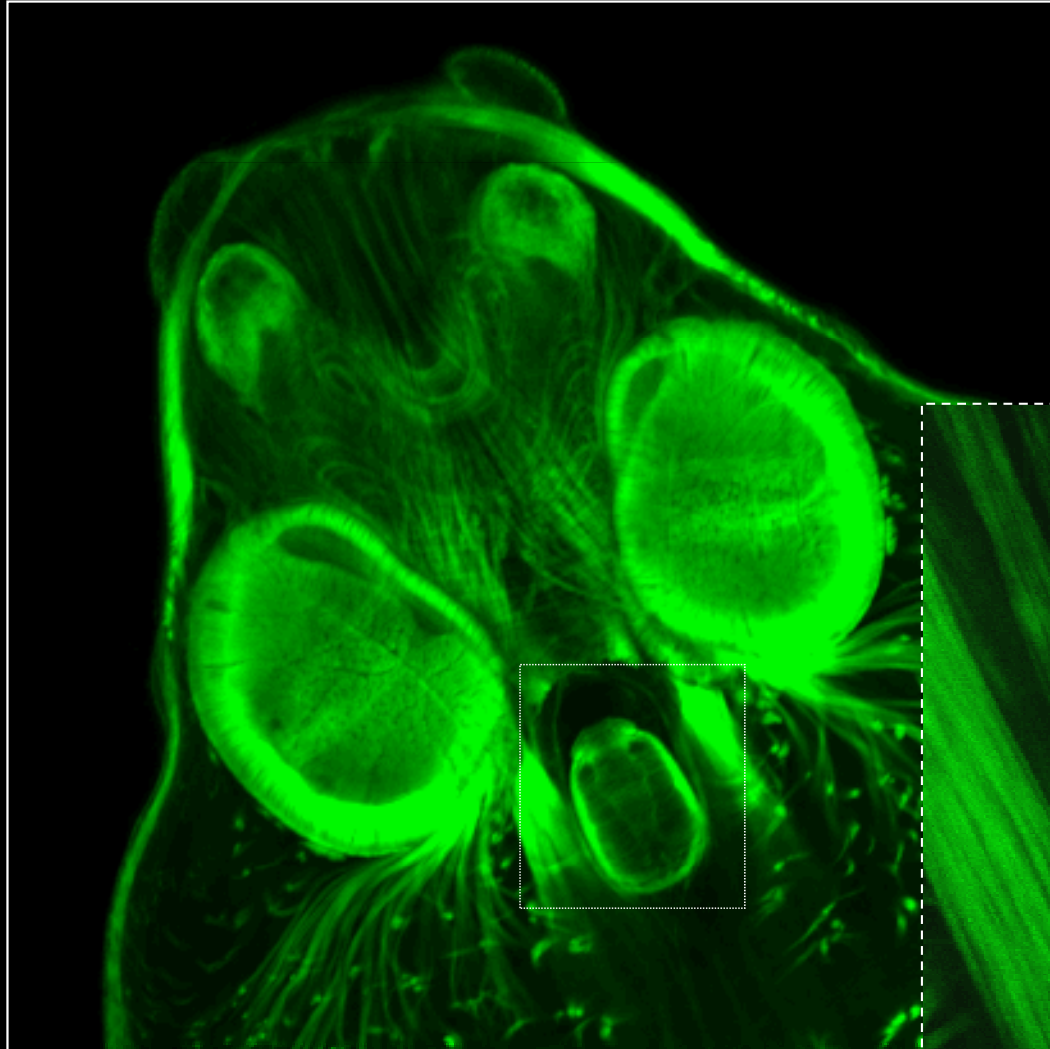
- procházející světlo
- fluorescence - struktura buňky a tkáně, studium metabolických drah, ...



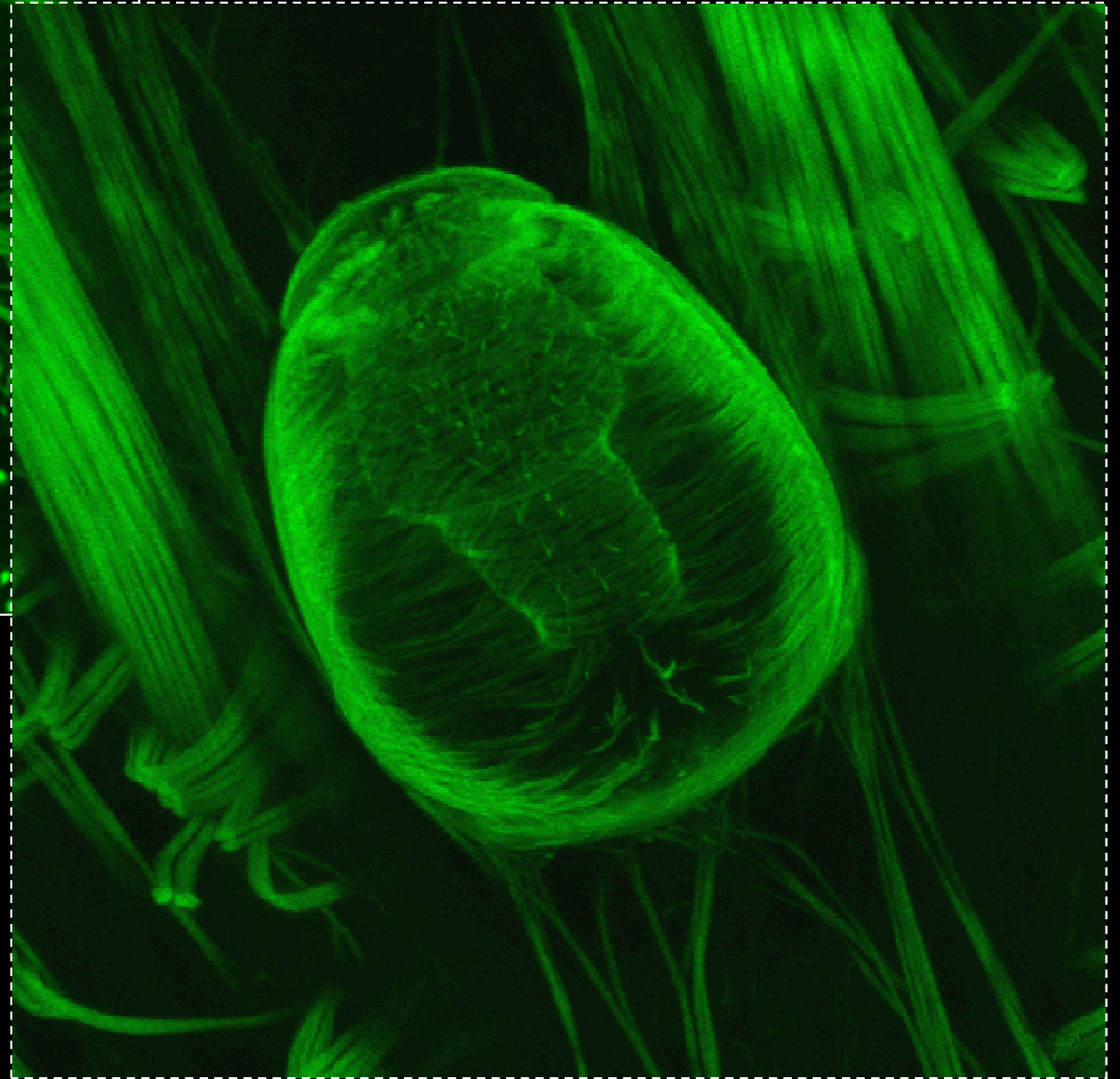


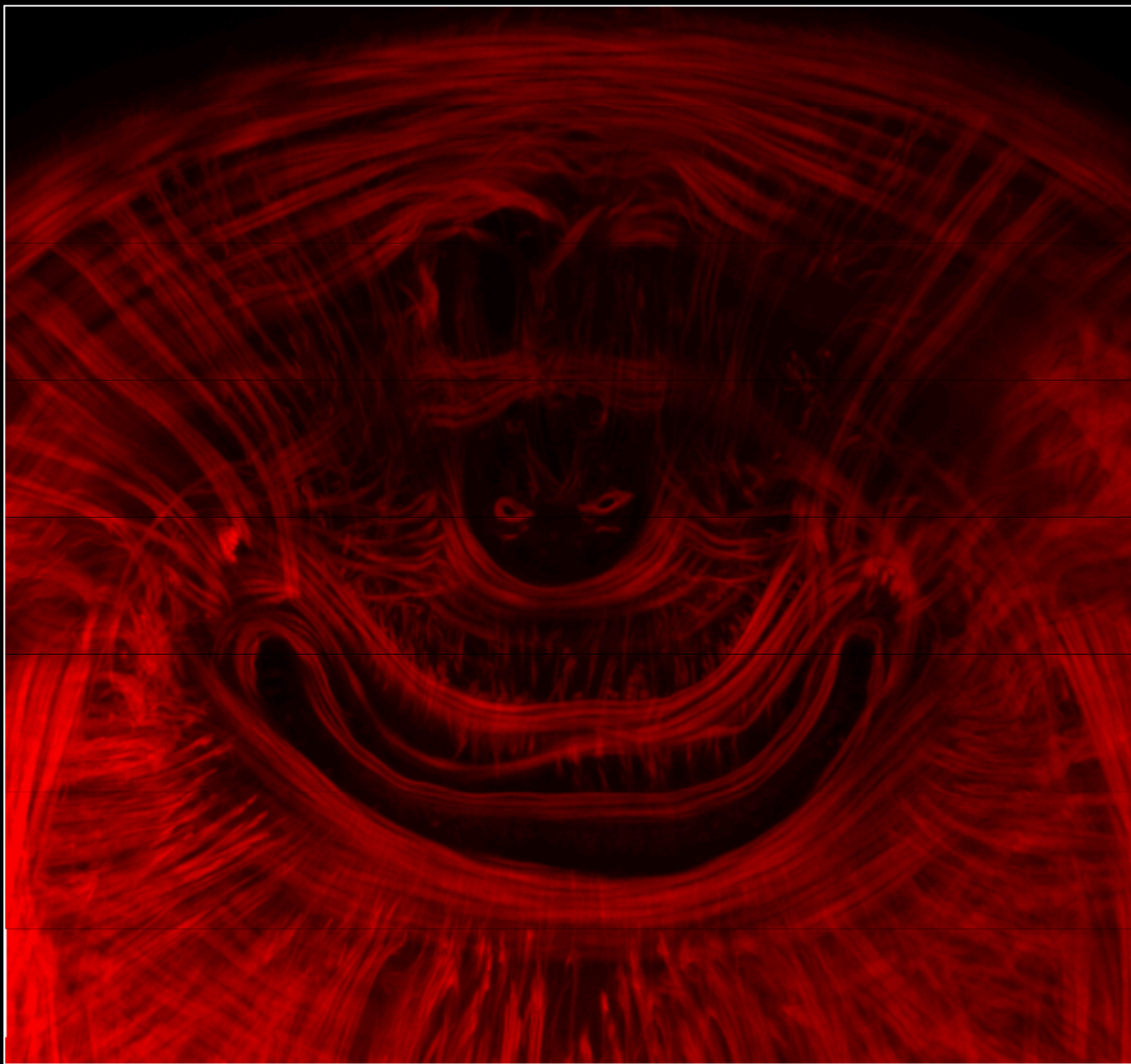


● vazba aktin-faloidin (FITC)



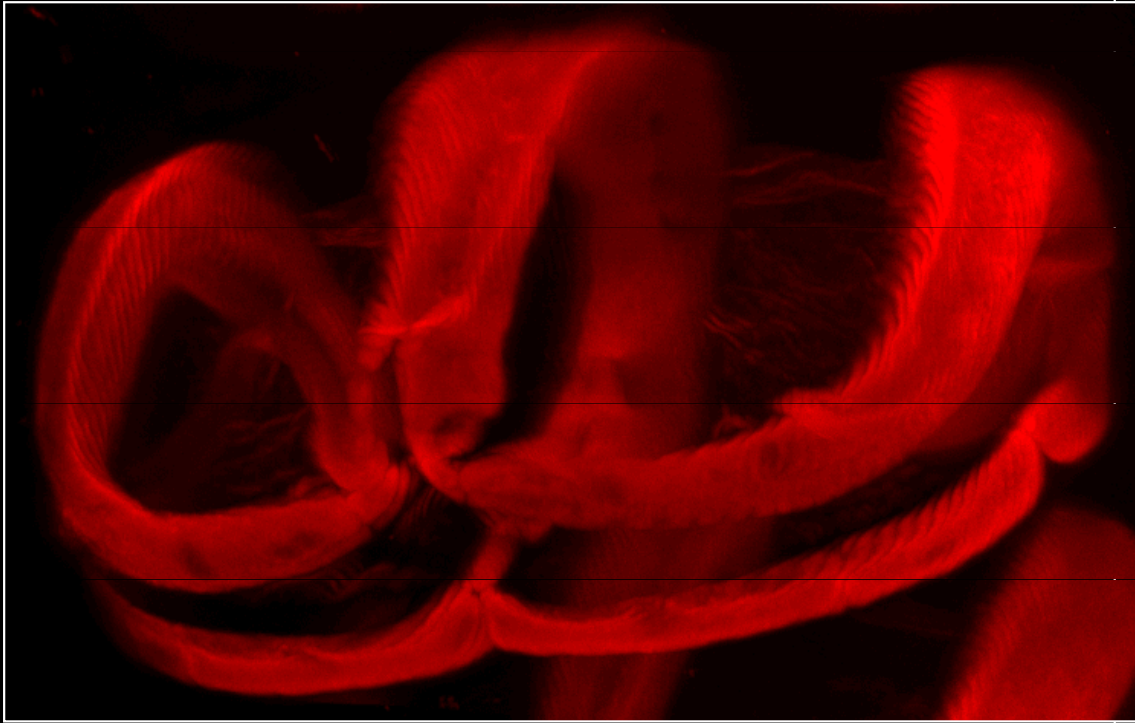
● vazba aktin-faloidin (FITC)





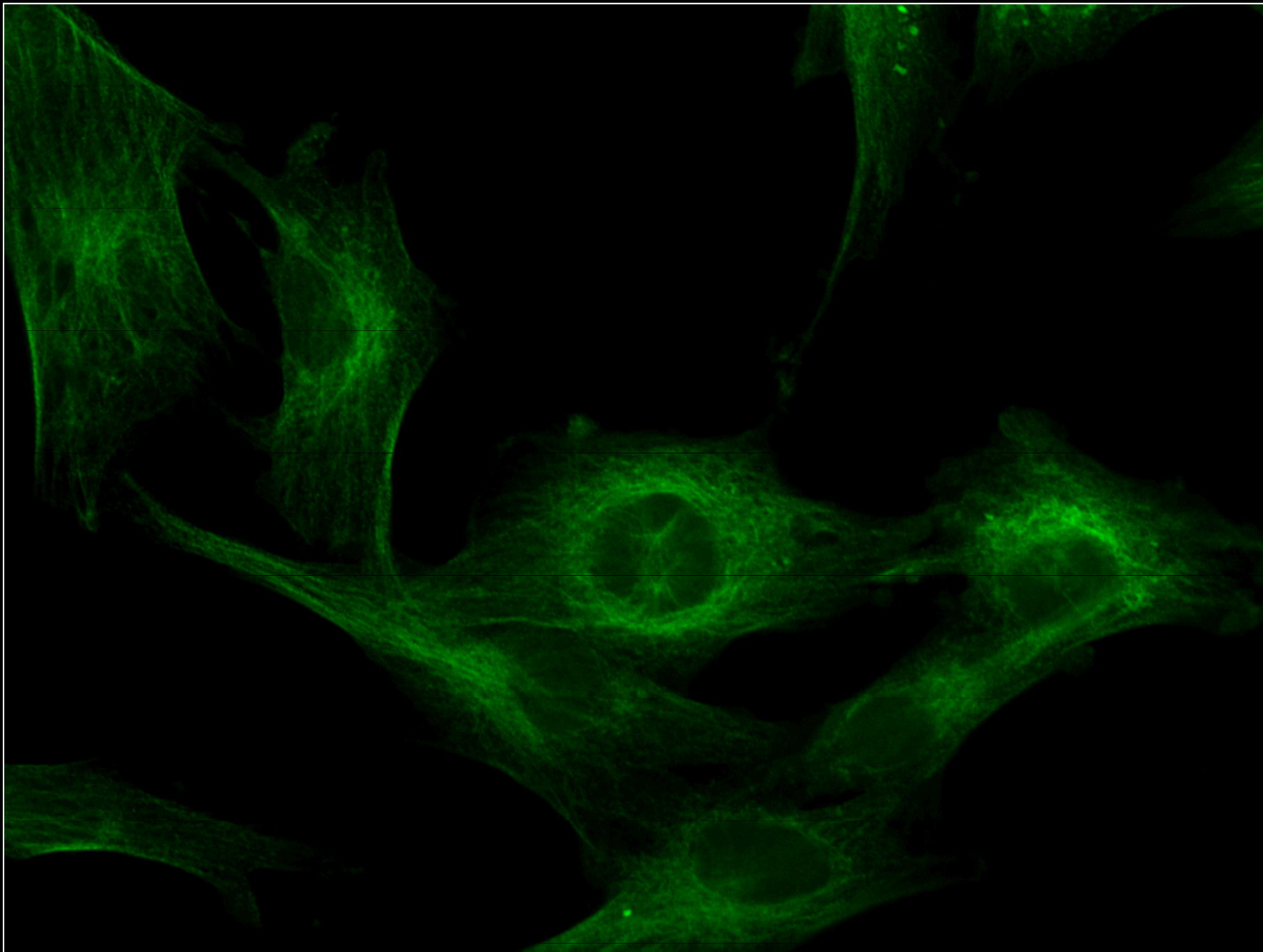
● vazba aktin-faloidin (TRITC)



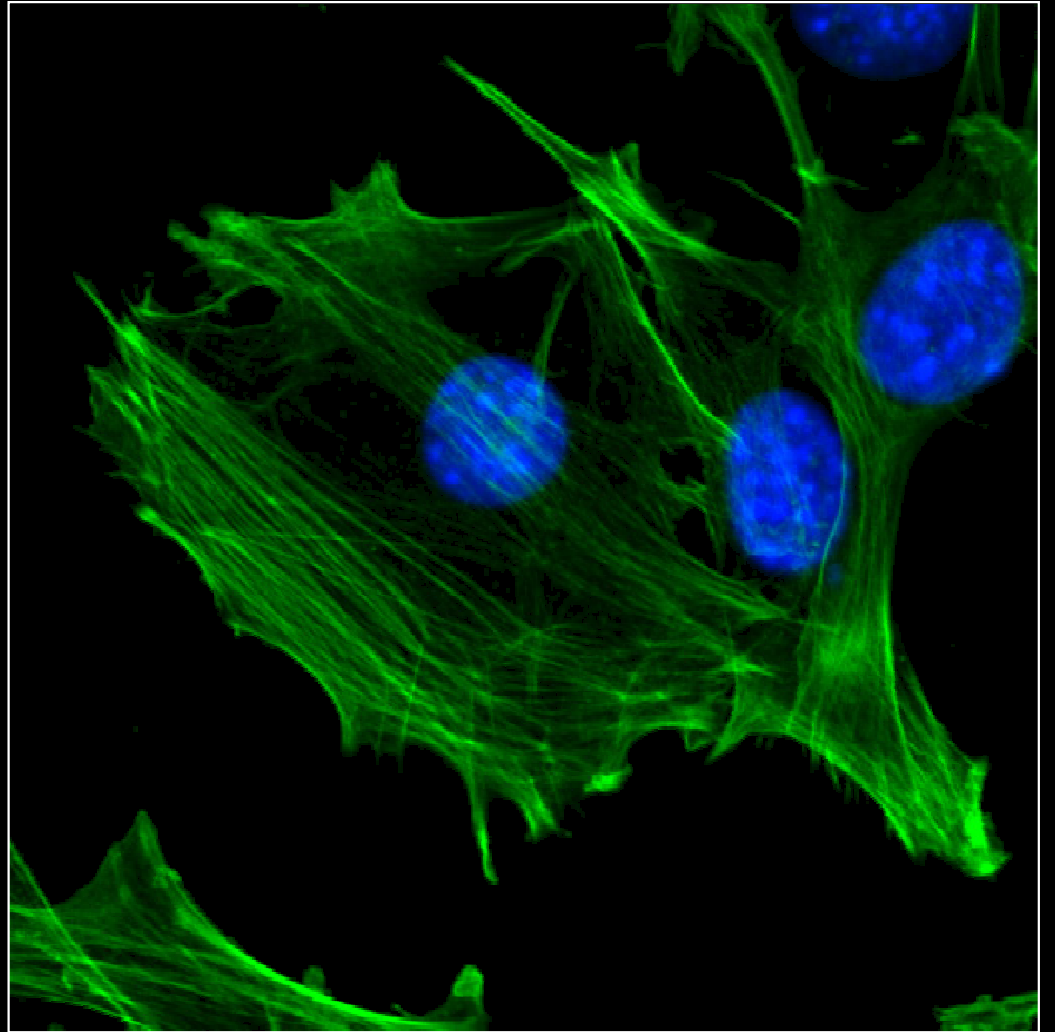
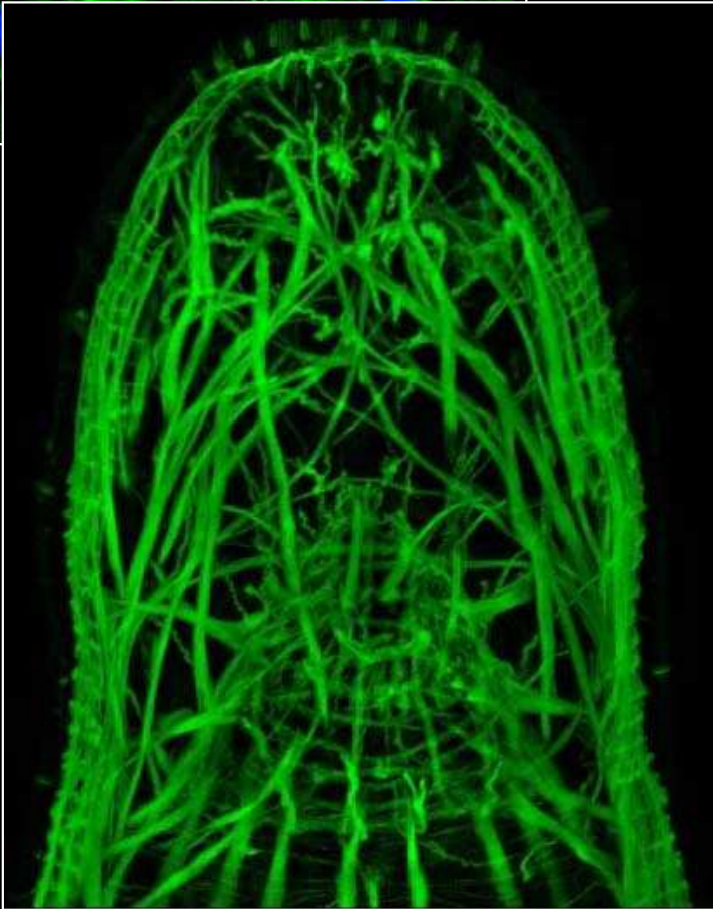
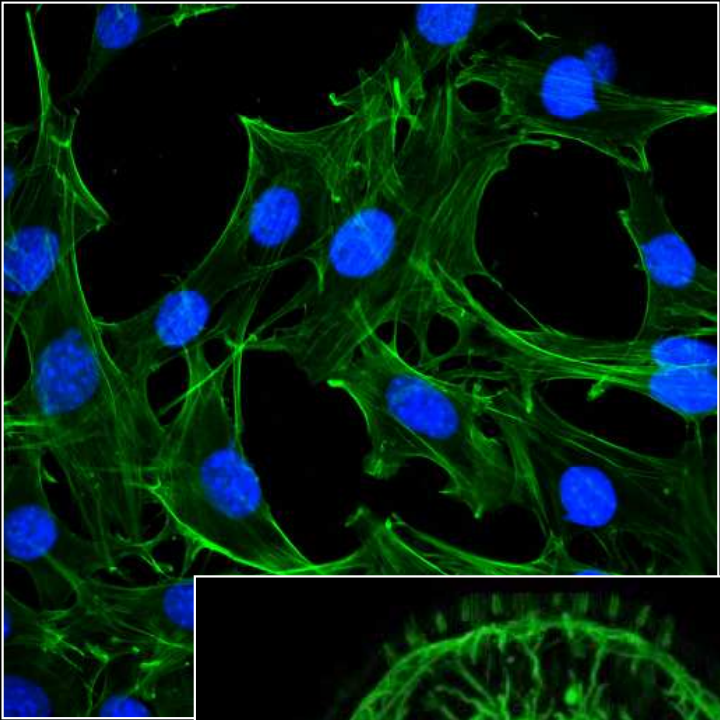


● fluorescence *Gomoriho trichomu*



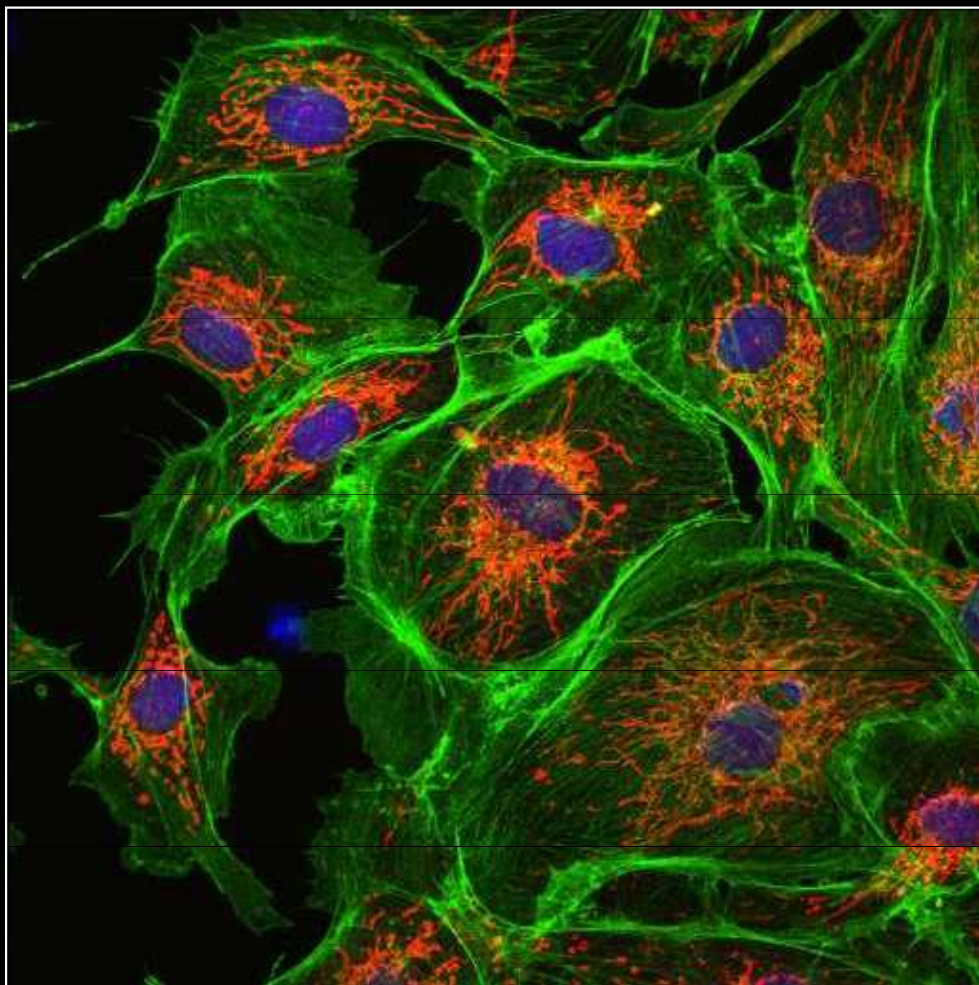


● vazba tubulin-protilátka (FITC)

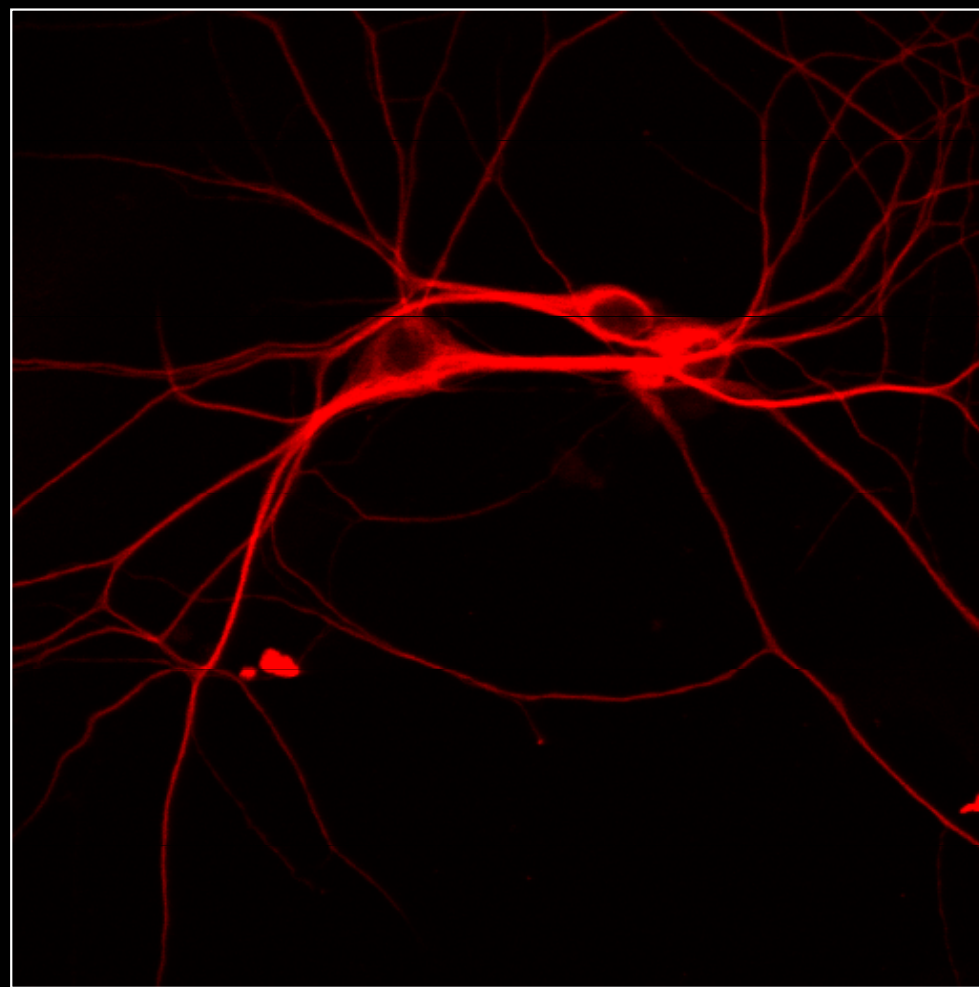


● vazba aktin-faloidin (FITC)

● vazba DNA-DAPI

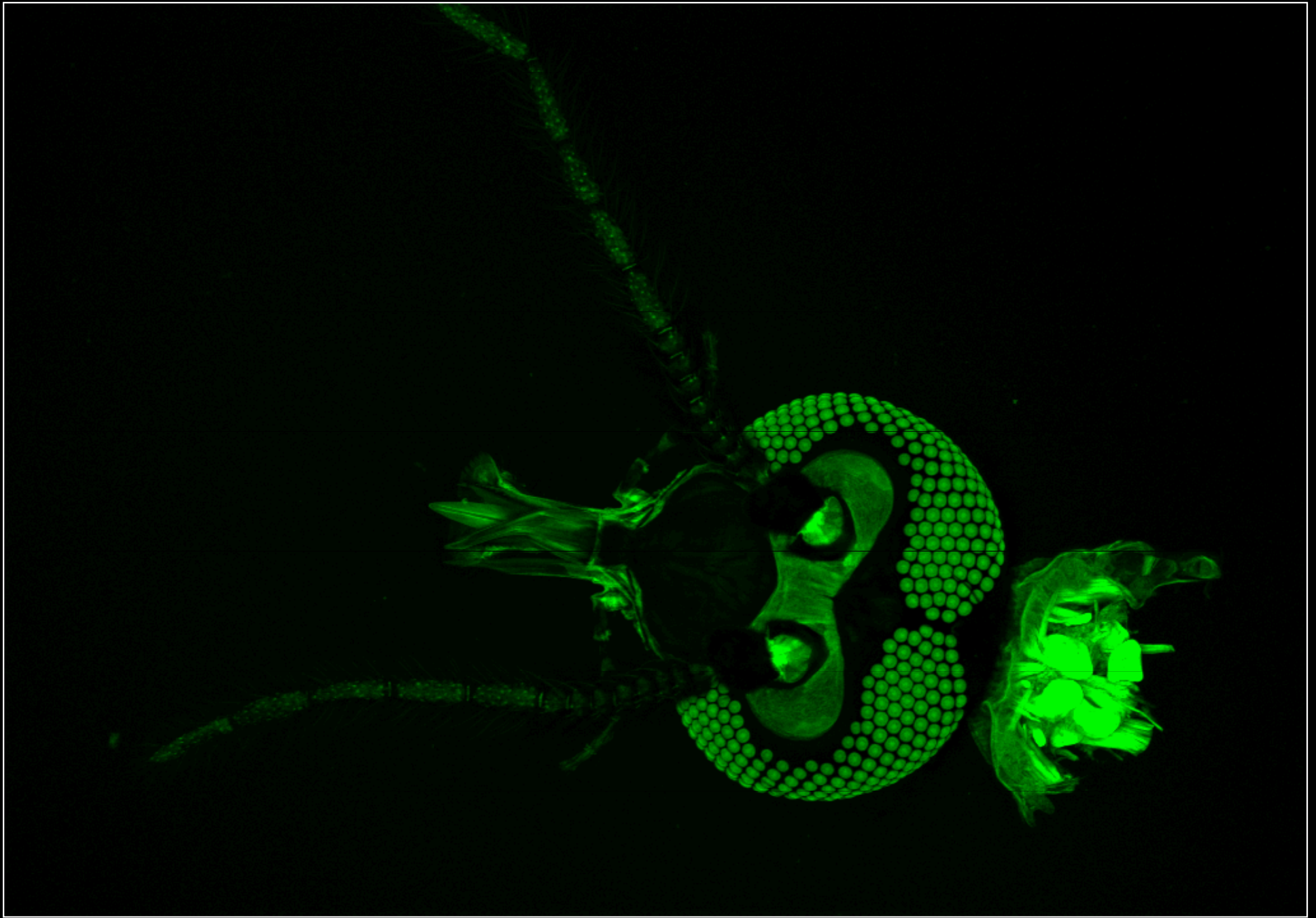


- vazba aktin-faloidin (FITC)
- vazba DNA-DAPI
- vazba mitochondrie-mitotracker red



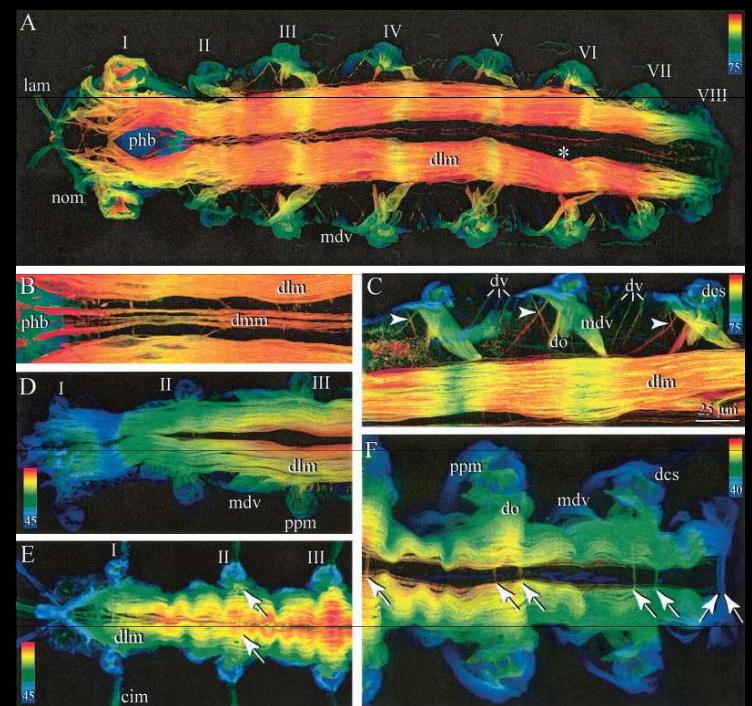
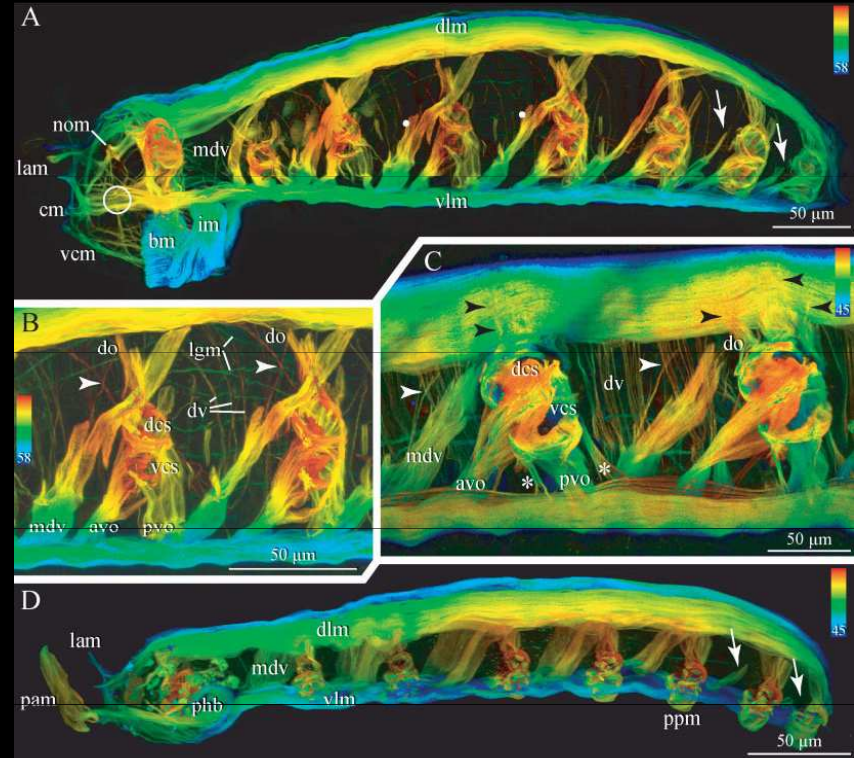
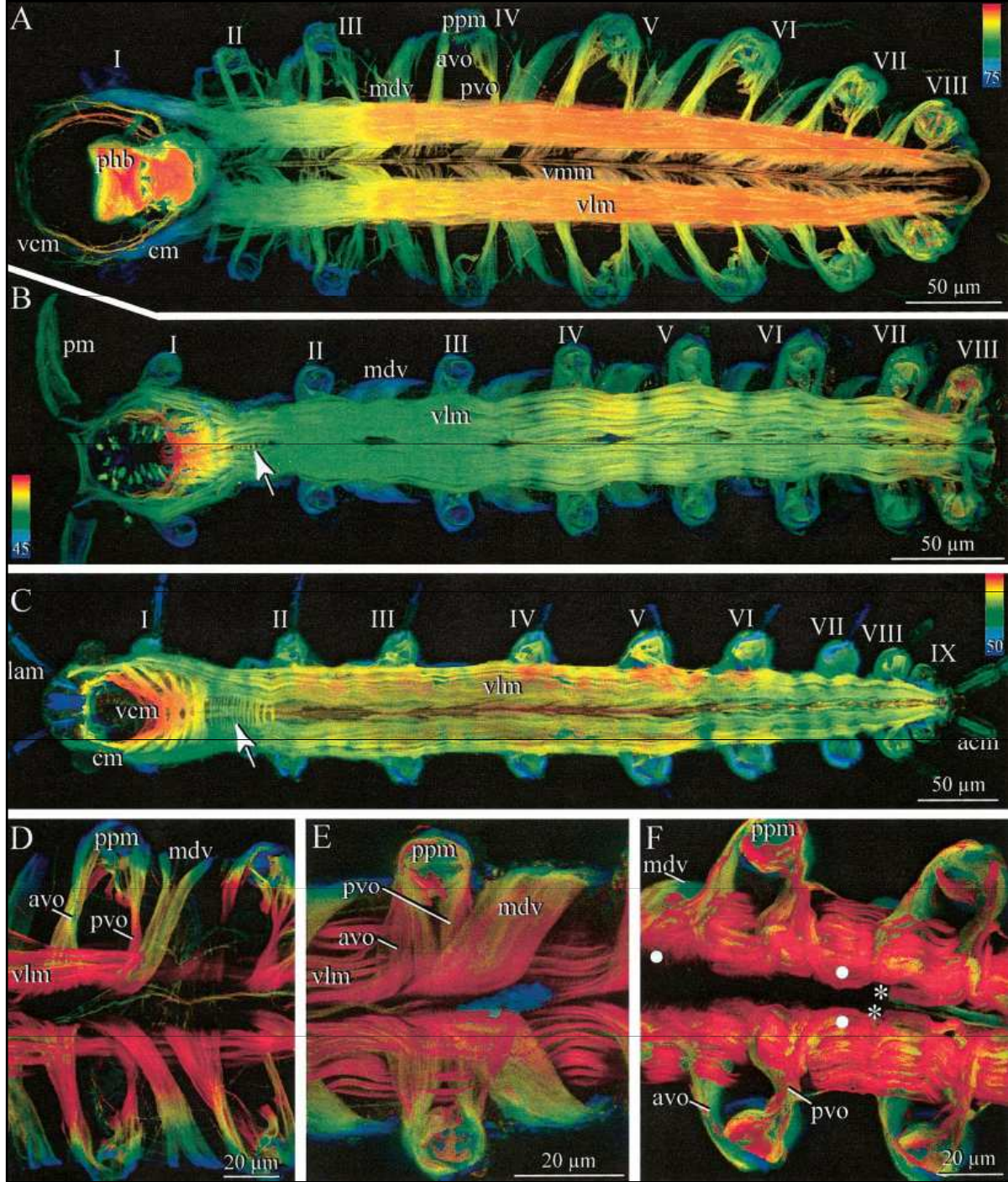
- neuron, vazba mikrotubulové proteiny-protilátka (Texas-RED)





● autofluorescence

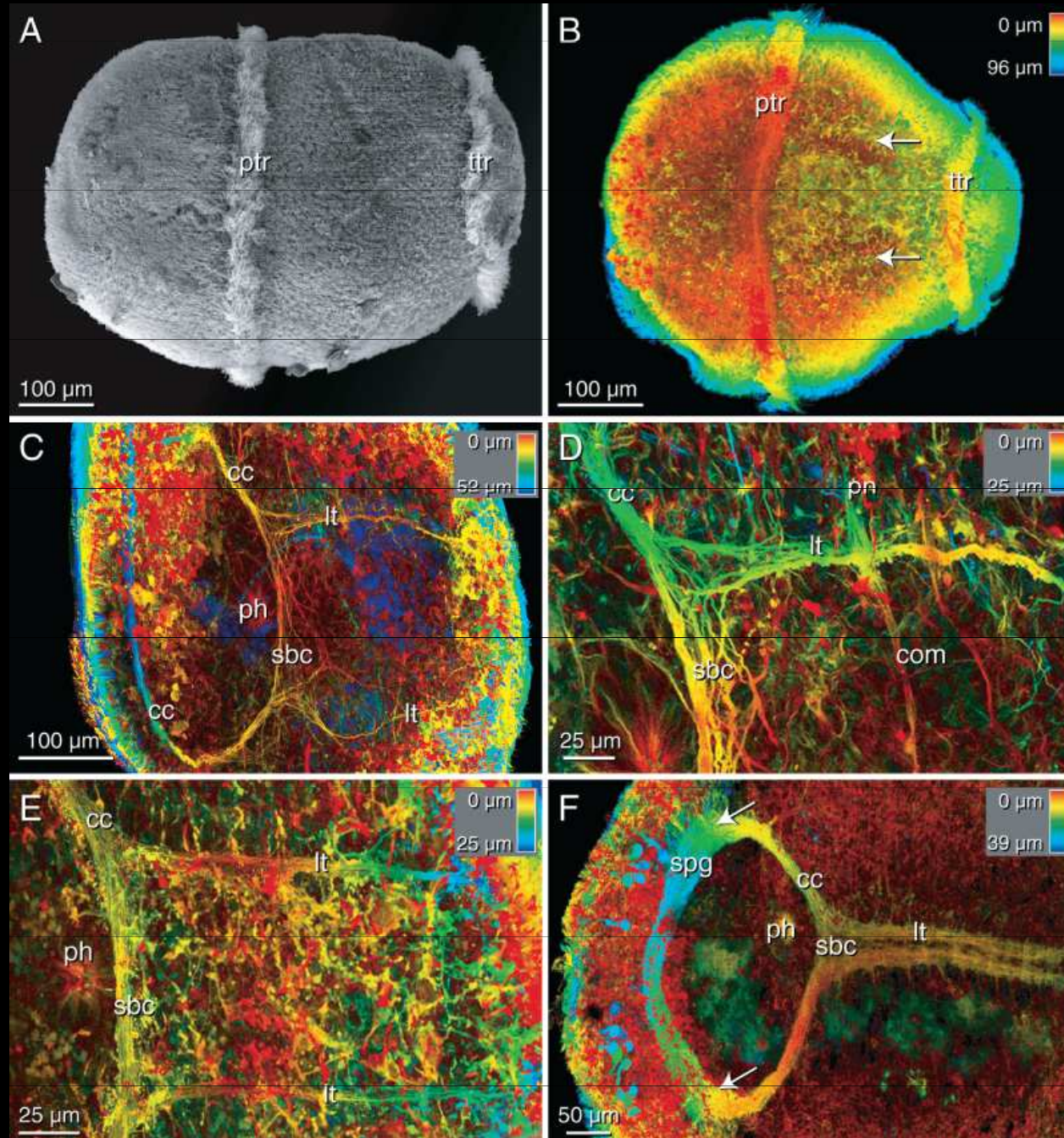




Muller, Worsaae (2006) Phalloidin, F-actin: Annelida; body wall musculature



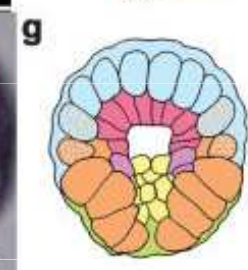
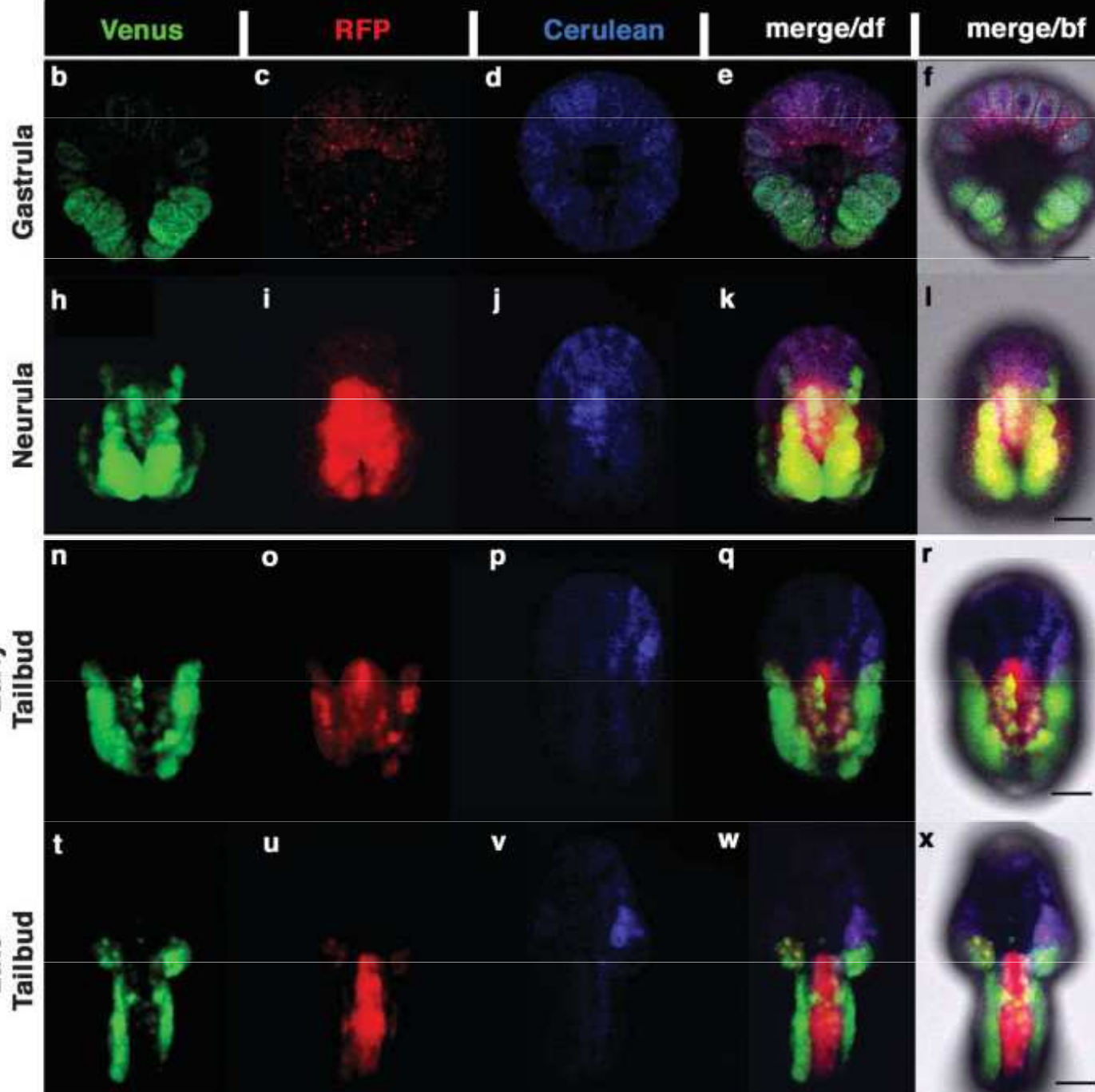
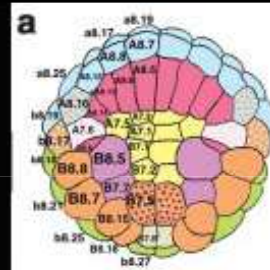
# NERVOVÝ SYSTÉM - *BONELLIA VIRIDIS* (ECHIURA)



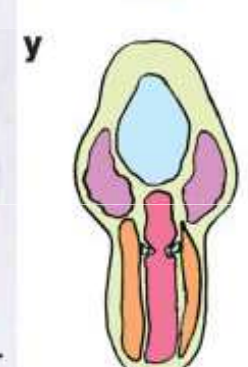
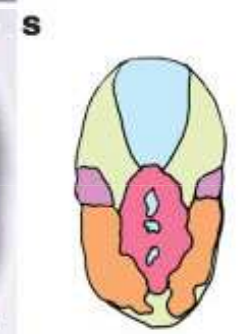
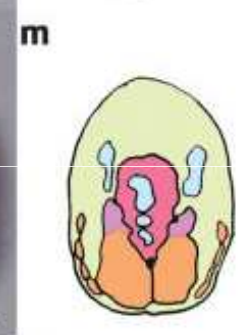
Anti-tyrosinated tubulin  
immunoreactivity,  
ventral view, depth-  
coding



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



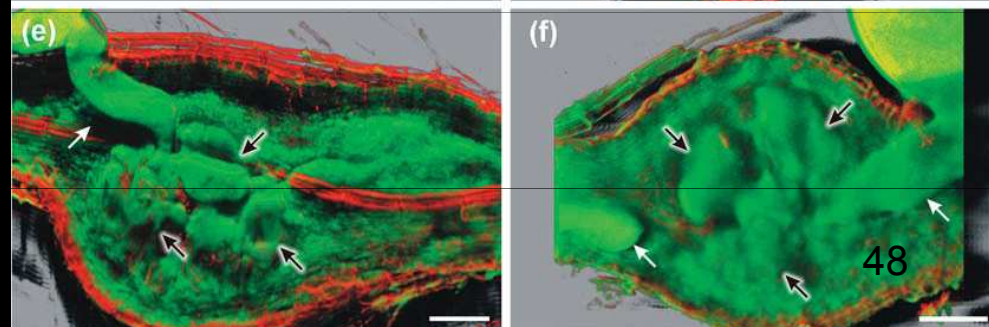
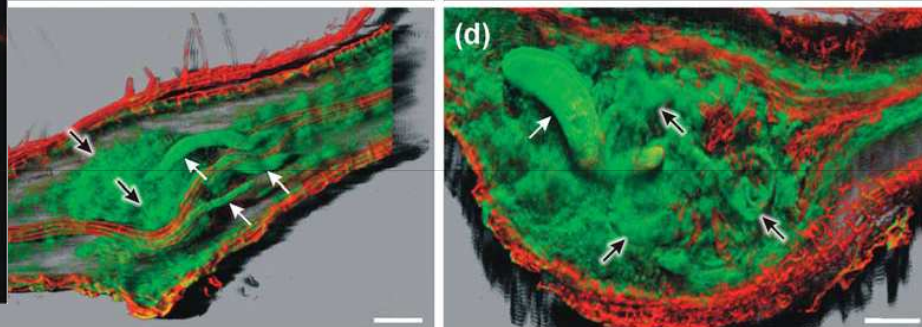
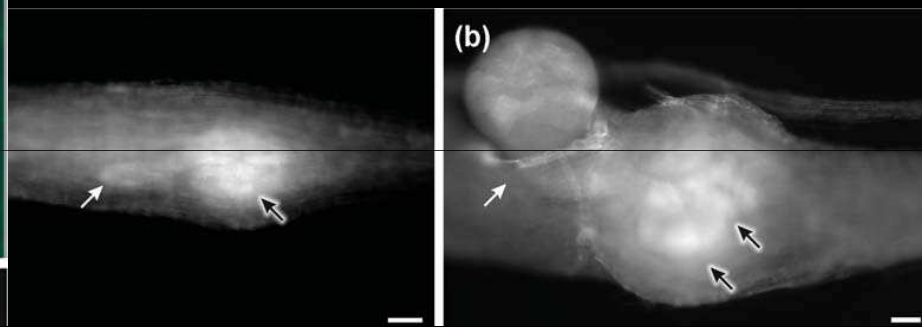
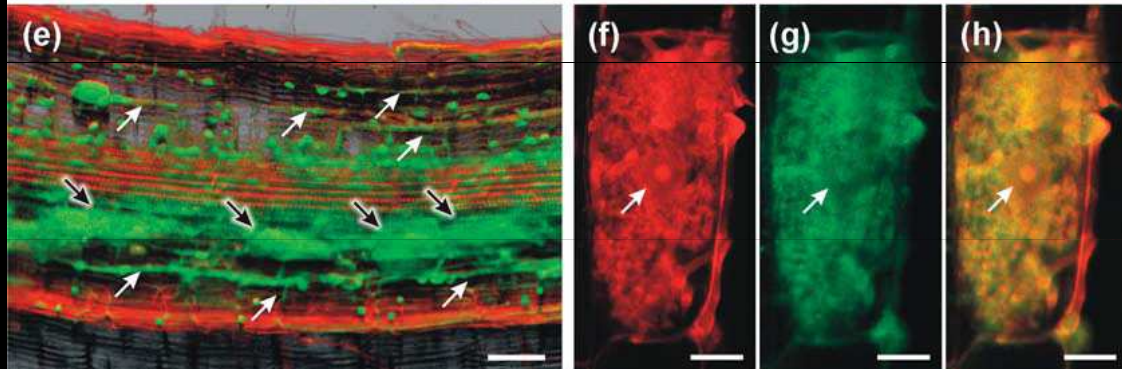
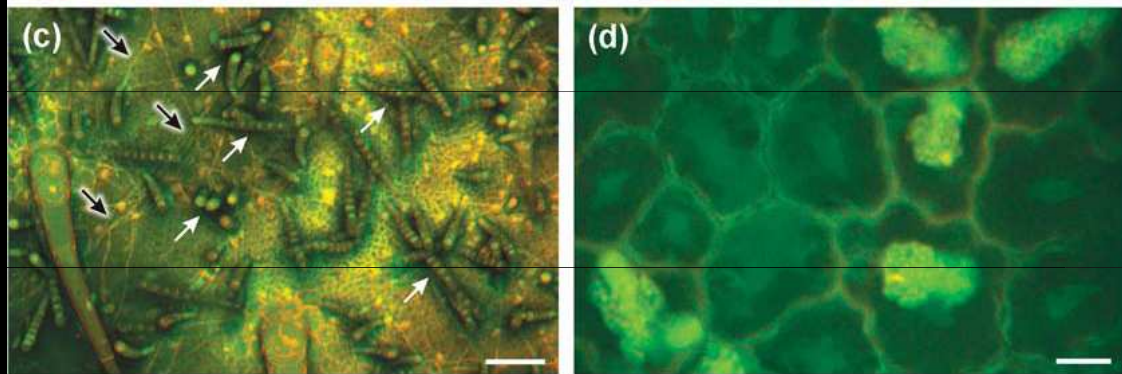
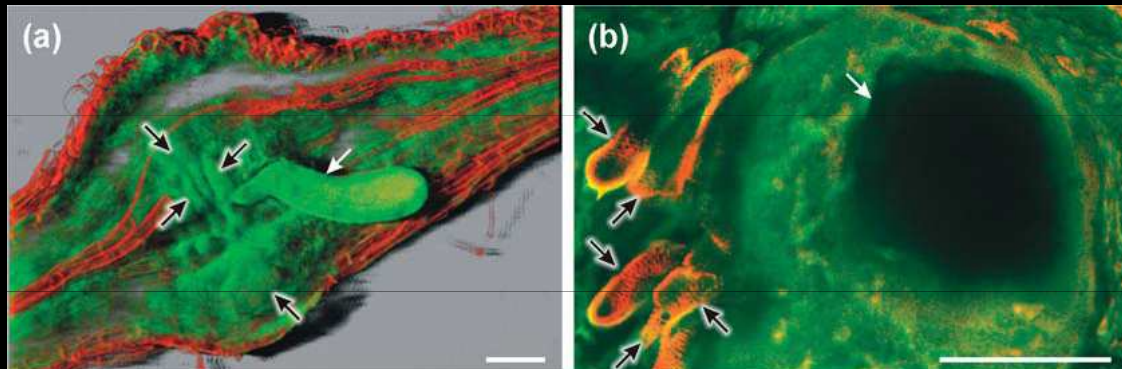
In vivo labeling of different embryonic territories with three spectrally distinct fluorescent proteins



Rhee et al. 2005

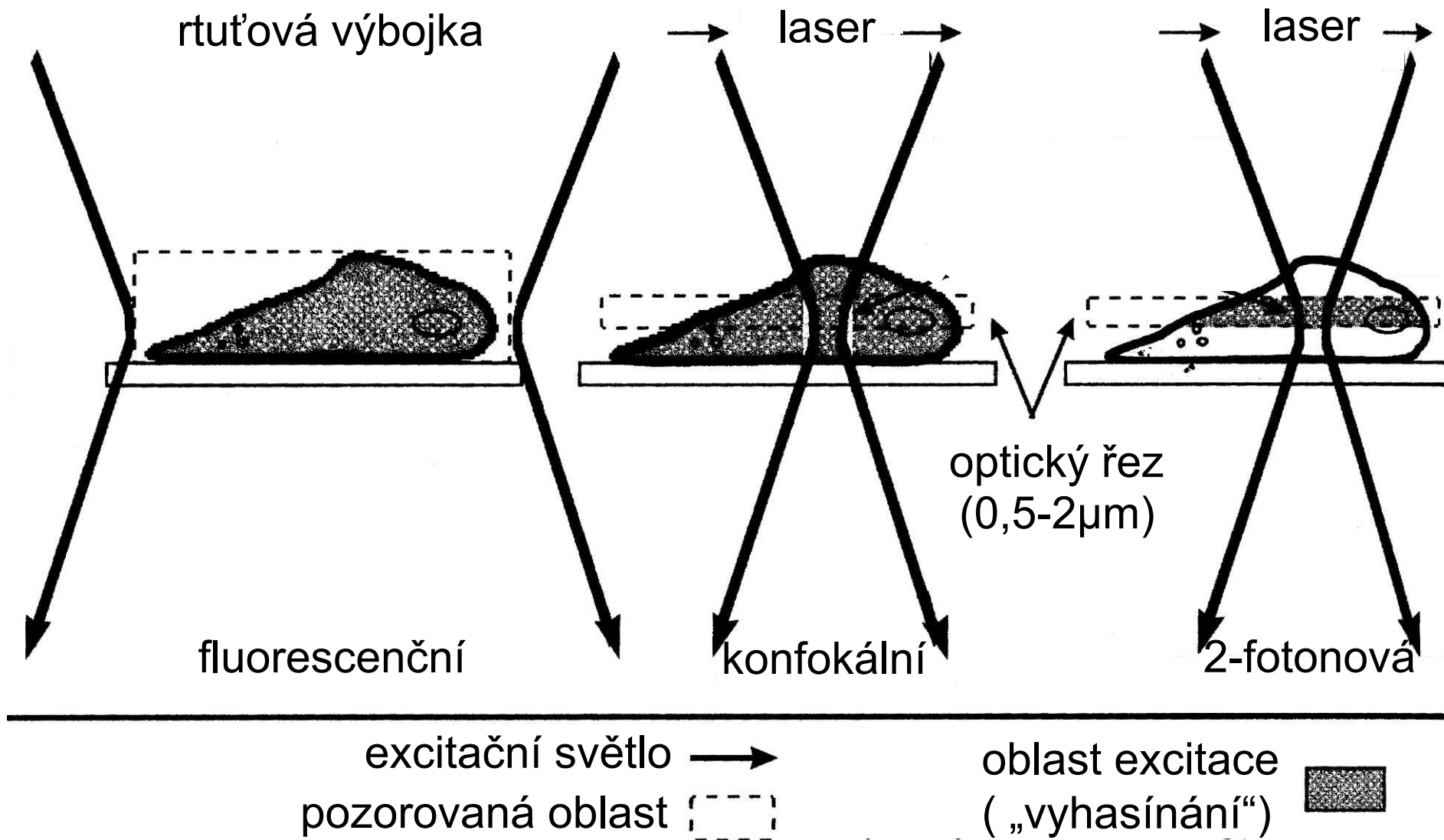


**glutaraldehyde-introduced  
fluorescence for  
the microscopic analysis of plant  
biotrophic interactions**



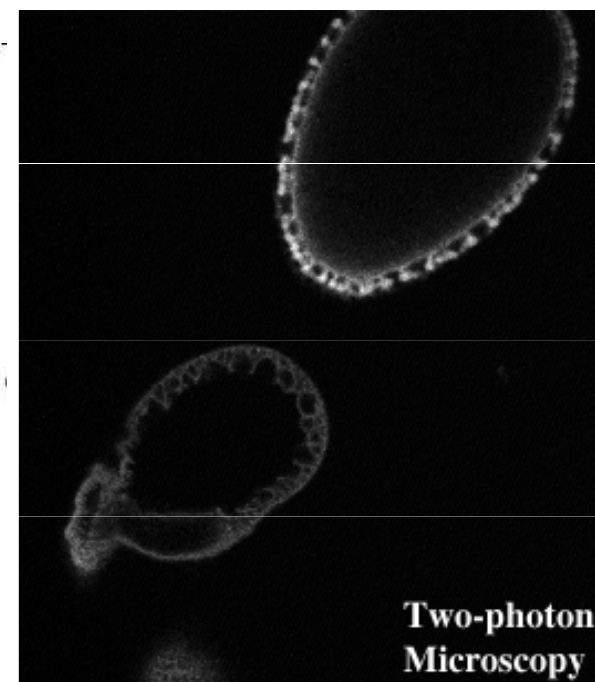
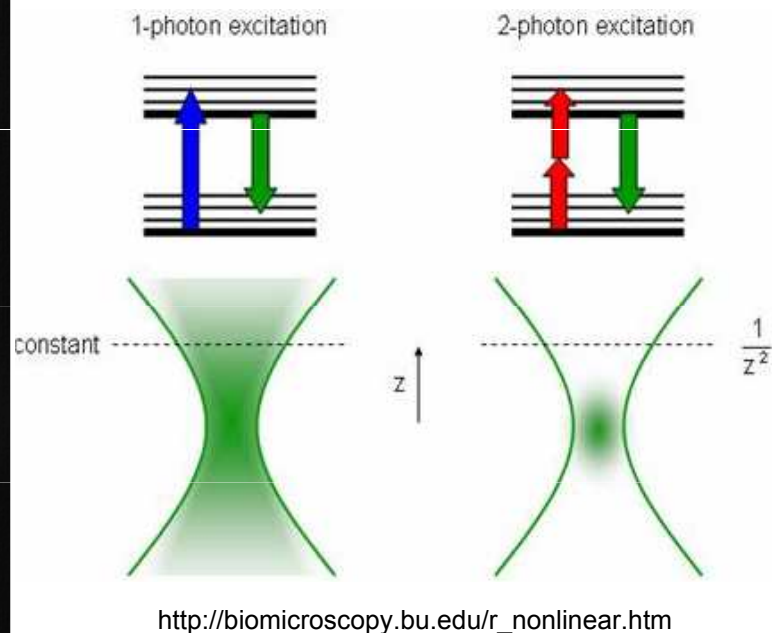
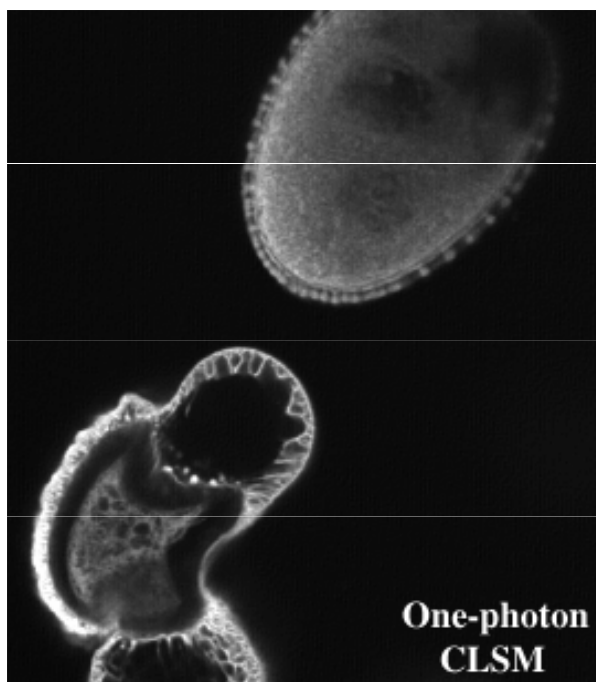
FESTER et al. 2008

# Srovnání 3 metod užívaných ve fluorescenční mikroskopii



# Dvoufotonová mikroskopie

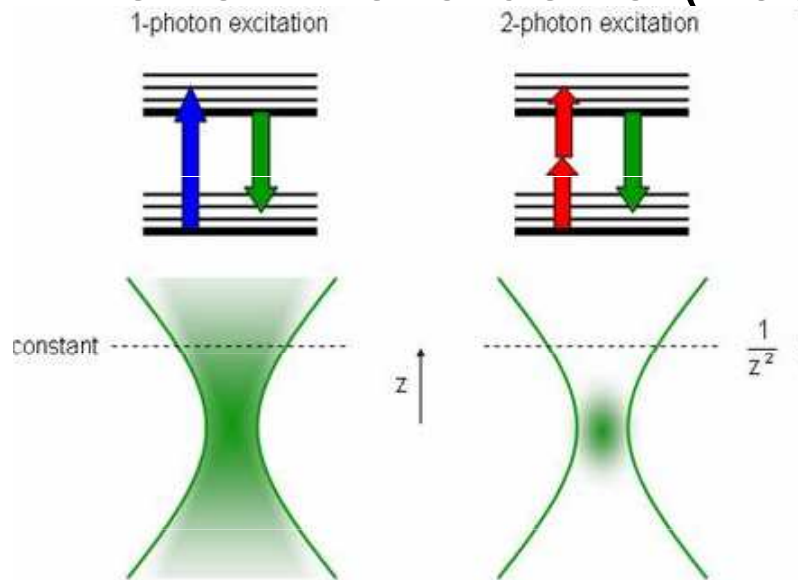
- absorpce 2 fotonů fluorochromem ve stejném okamžiku => záření s dvojnásobnou vlnovou délkou (poloviční energie) => excitační záření 700 nm => emitované záření 900 nm





# 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

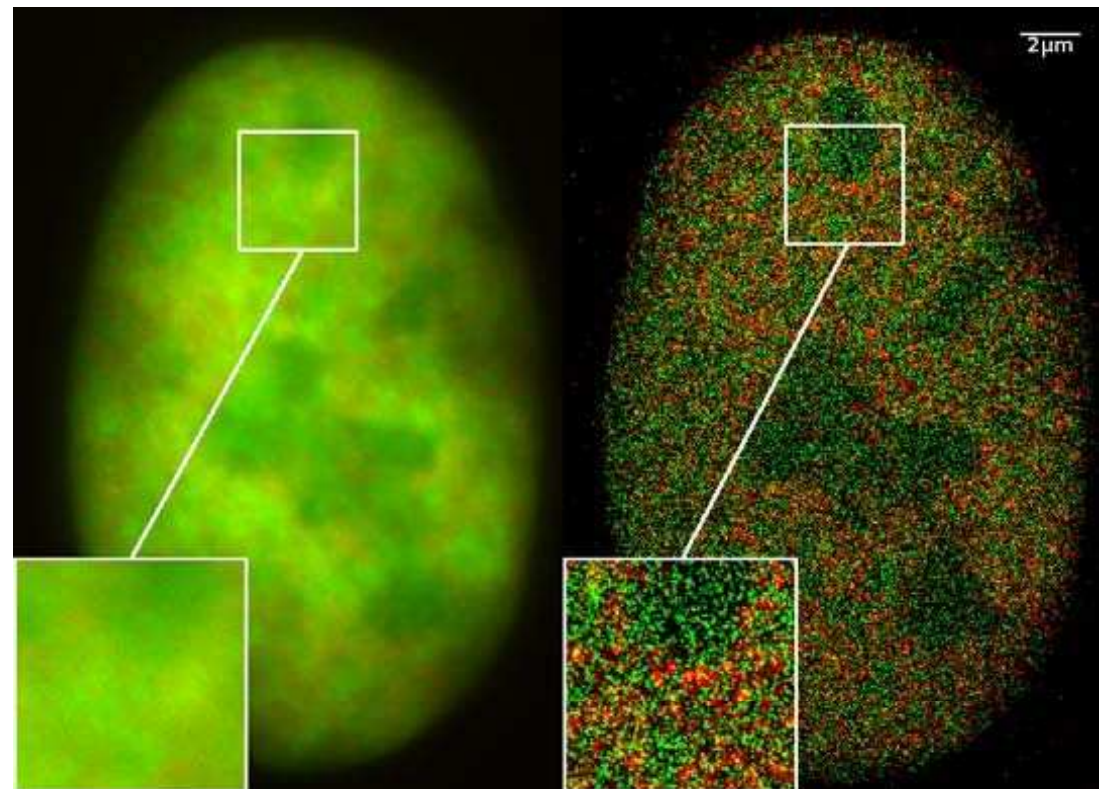
- cena Ti:Sapphire laseru
- ohřev vzorku => užití laserových pulsů než plynulé ozáření

# Superrozlišovací mikroskopie

- **4Pi mikroskopie** - 2 stejné objektivy, každý na opačné straně vzorku, zaostřené na stejné místo
- **Mikroskopie se strukturovaným osvětlením (SIM)** - osvětlení vzorku světlem s pruhovaným vzorem vzniklým difrakcí na mřížce
- **Skenovací optická mikroskopie blízkého pole (NSOM)** - Near-field Scanning Optical Microscopy) zobrazuje vzorky pomocí skenování sondou nanometrových rozměrů
- **Vyčerpání stimulovanou emisí (STED)** - (STimulated Emission Depletion) využívá možnosti vyčerpání energie z fluoroforu stimulovanou emisí
- **STORM, PALM a FPALM**

-(STochastic Optical Reconstruction Microscopy) , PALM (PhotoActivation Localization Microscopy) a FPALM (Fluorescence PhotoActivation Localization Microscopy) byly nezávisle publikovány krátce po sobě a využívají stejný princip.

Fluorofory pro tyto techniky mají dva stavy, jeden schopný fluorescence a druhý fluorescence neschopný, které se dají přepínat světlem různých vlnových délek nebo se přepínají stochasticky. Ve stavu schopném fluorescence se nachází vždy jen velmi malý podíl všech fluoroforů, jejichž fluorescence se snímá, dokud nedojde k jejich vybělení. Poté se převede do stavu schopného fluorescence další malá část fluoroforů a snímají se, dokud se nevybělí...





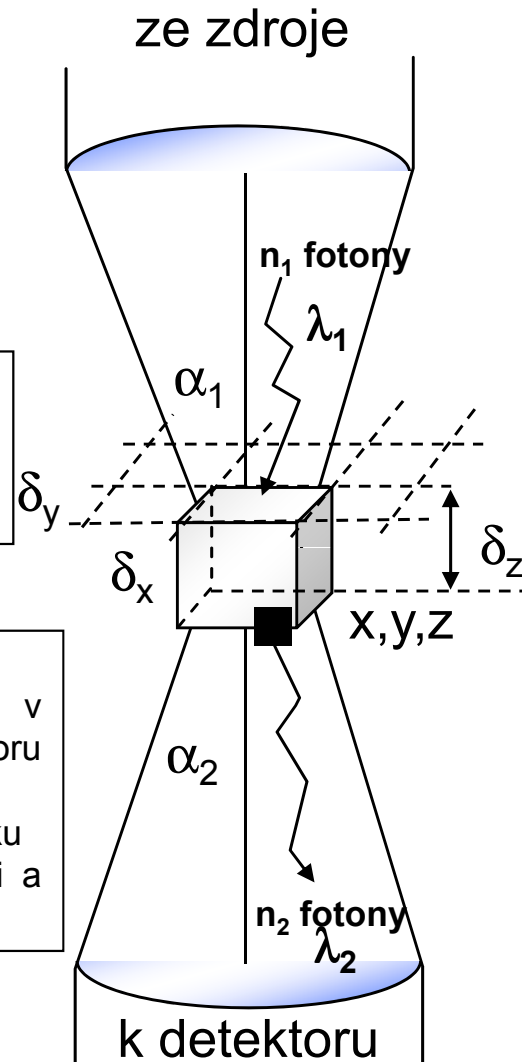
# Základní omezení konfokální mikroskopie

## PIXEL

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

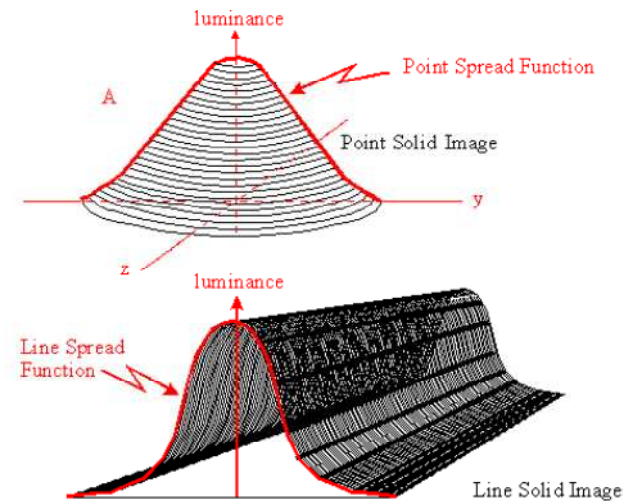
## VOXEL

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



# konvoluce

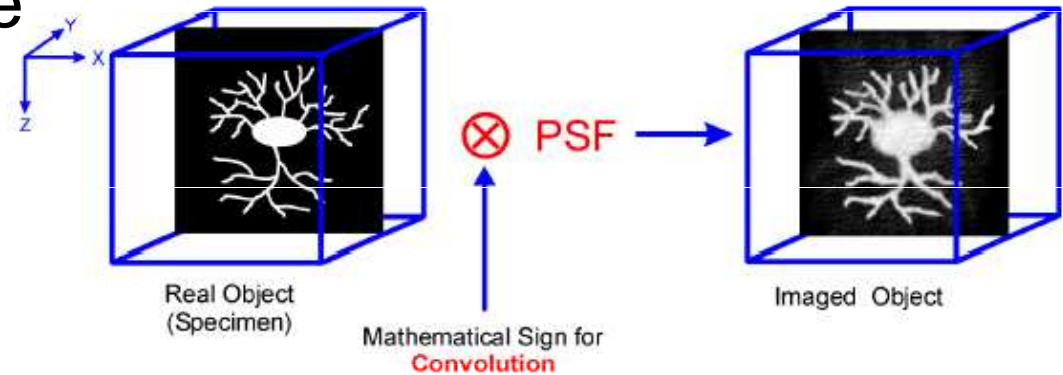
- zkreslení díky nedokonalosti optických zařízení
- bodová rozptylová funkce = PSF - Point Spread Function - důvod „rozmazání“ obrazu



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

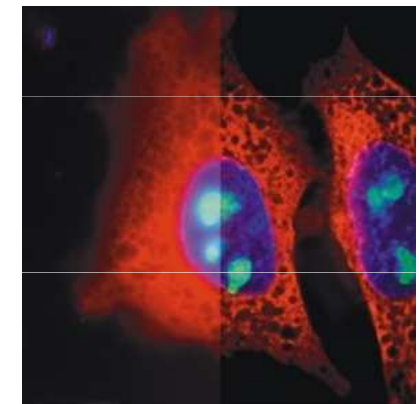
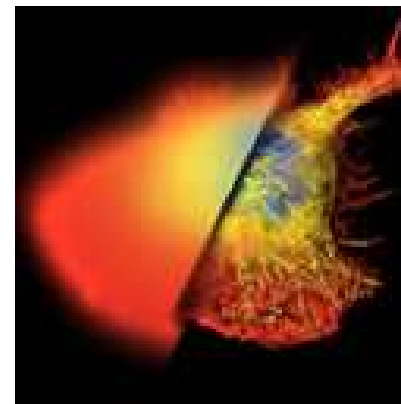
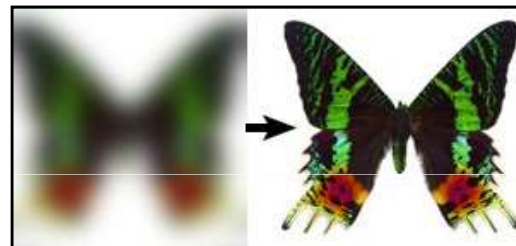
[Table of Contents](#)

[Spread Functions](#)

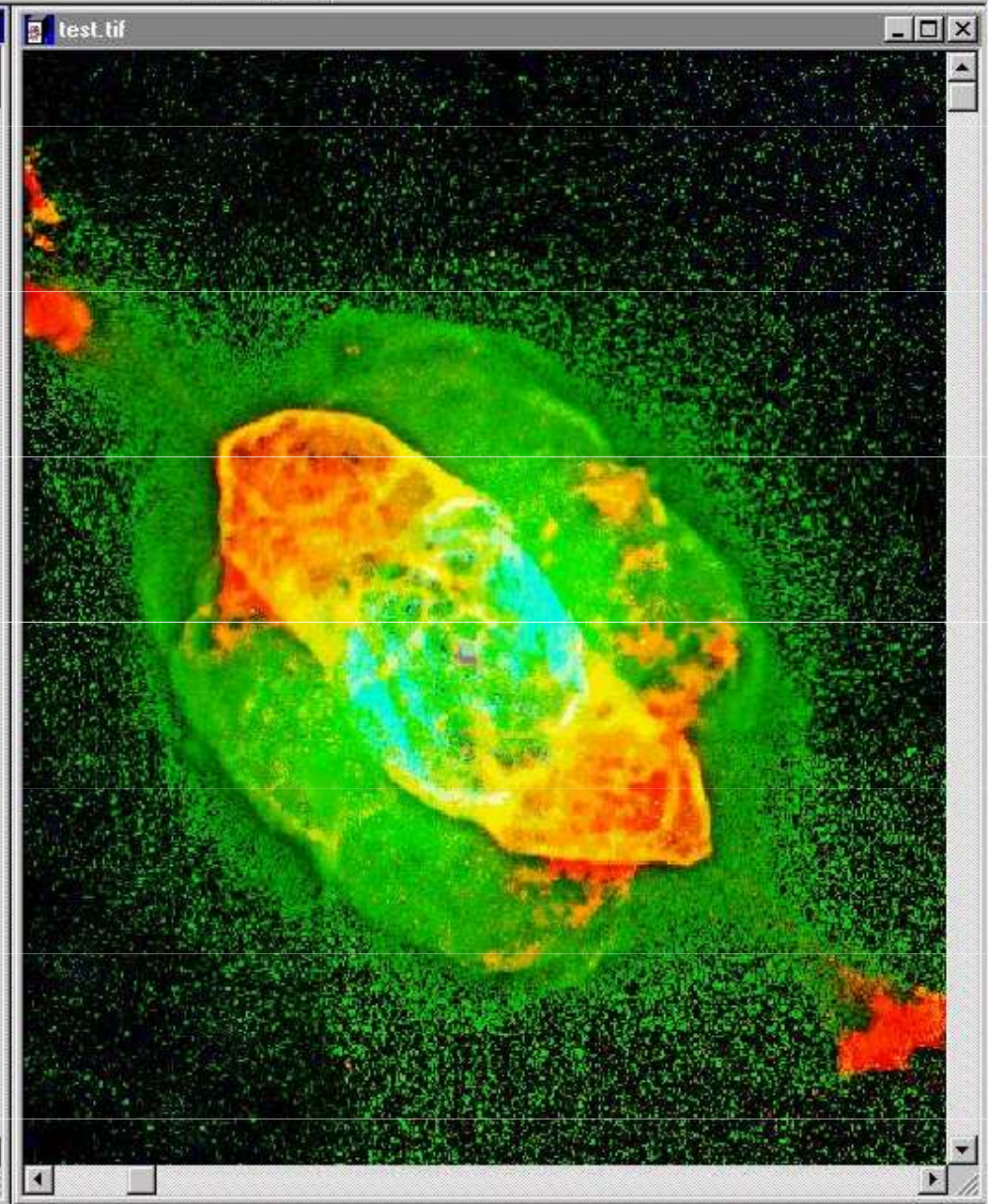
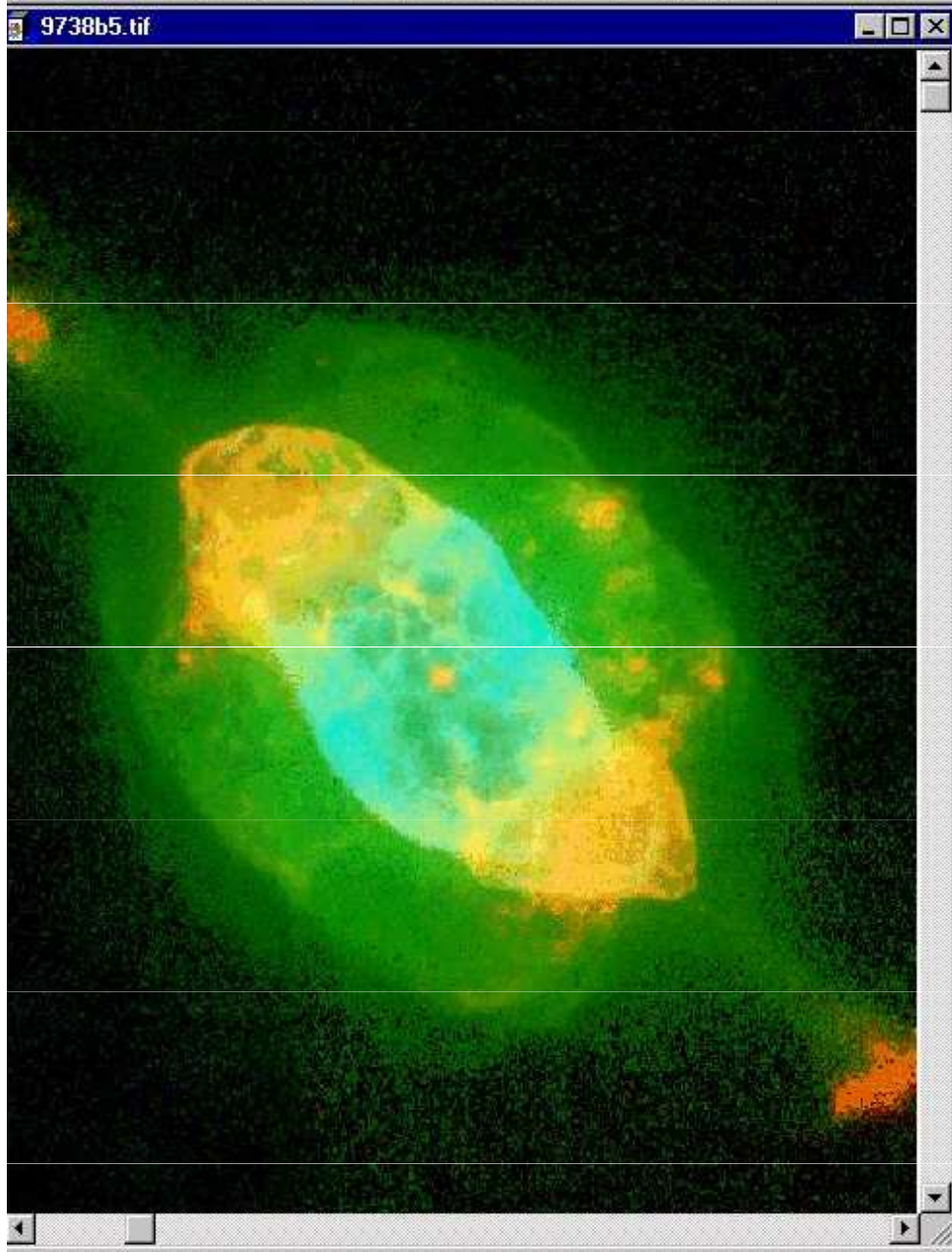


# dekonvoluce

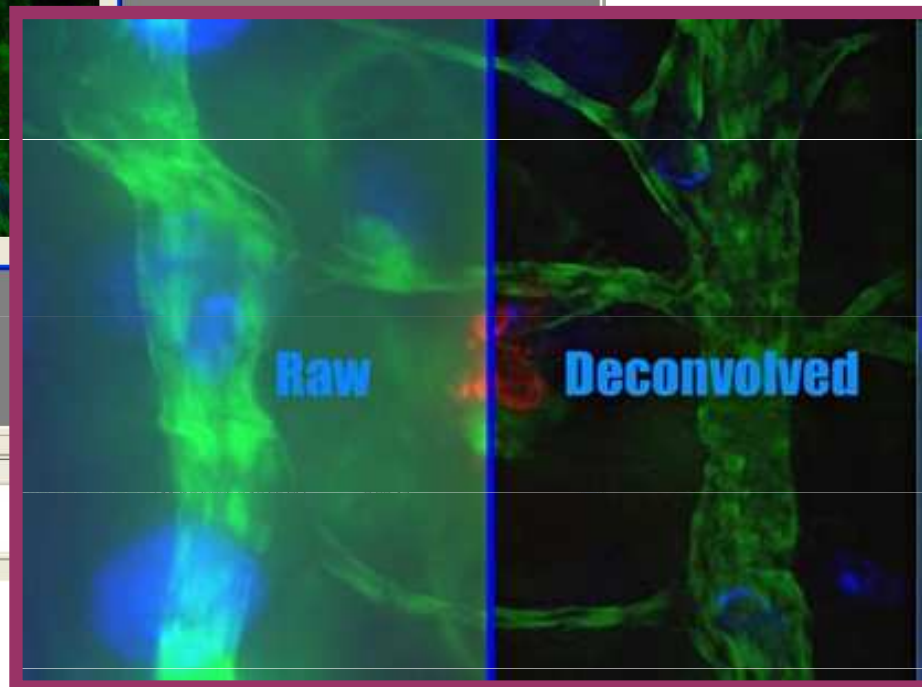
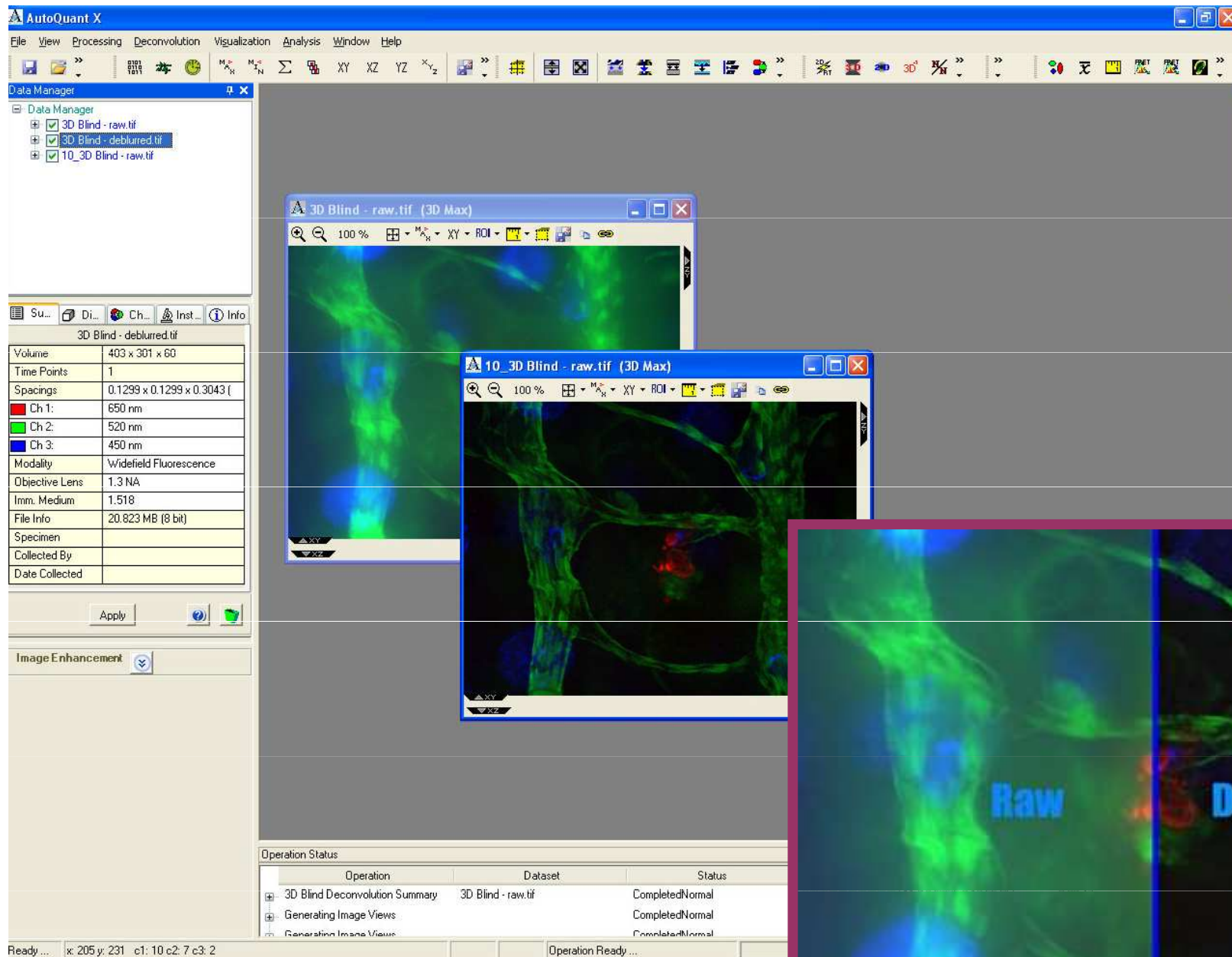
matematické zpracování obrazu, které redukuje rozmazání obrazu a vylepšuje kontrast a rozlišení











AutoDeblur® AutoQuant®

# 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/cain\\_foundation/noframes/html/pages/staff/robert\\_mcneil.htm](http://www.bcm.edu/cain_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://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

