

Imunohistochemie – konfokální mikroskop

LSCM = laser scanning confocal microscopy

- Společně jsme skončili u kroku, kdy jste zalepili svá skla s řezy pomocí mounting media a umístili je na utužení do lednice
- Dalším krokem je snímání fluorescence na konfokálním mikroskopu (**tohle si prosím vážně pusťte**) :

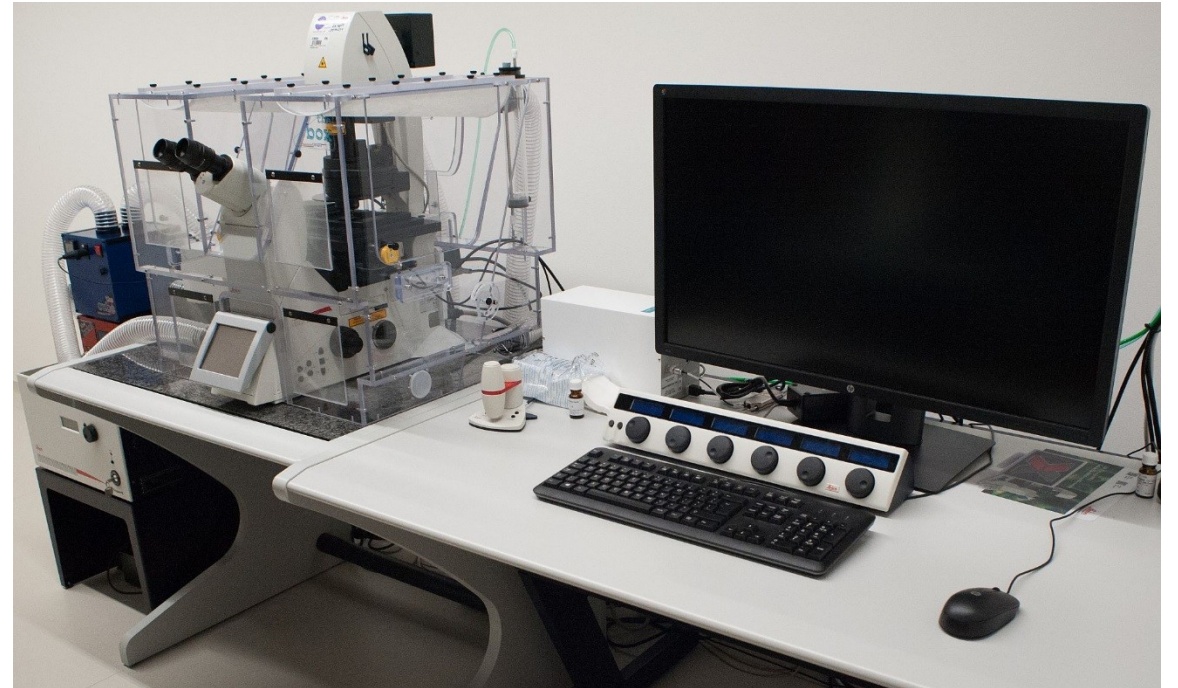
<https://www.youtube.com/watch?v=QFtZFbug1SA>

- Na A36 máme konfokální mikroskop Leica SP8, koho by to více zajímalo, může si projít na YT tutoriály ohledně nastavení:

<https://www.youtube.com/watch?v=5L5u6zZBgpw>,

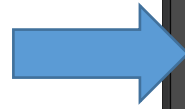
- více o metodách konfokální mikroskopie přímo od Leicy najdete tady:

<https://www.leica-microsystems.com/products/confocal-microscopes/#c297041>



LSCM

- Když otevřete software pro ovládání LSCM, uvidíte tohle
- Prvním krokem je základní nastavení vhodné pro naše měření, tzn. zvolíme si, jaké parametry snímání požadujeme
- V našem případě snímáme vzorky s hloubkou obrazu 12 bitů, ve formátu 1024x1024 rychlostí 600 Hz
 - Rychlost skenování udává, kolik rovin za sekundu je ve vzorku naskenováno, určuje časové rozlišení konfokálního systému. Vyšší hodnota Hz znamená větší časové rozlišení.



The screenshot displays the LSCM software interface, divided into several panels. The top bar shows the workflow: Configuration → Acquire → Process → Quantify → Analysis. The left panel is titled 'Acquisition' and contains the following settings:

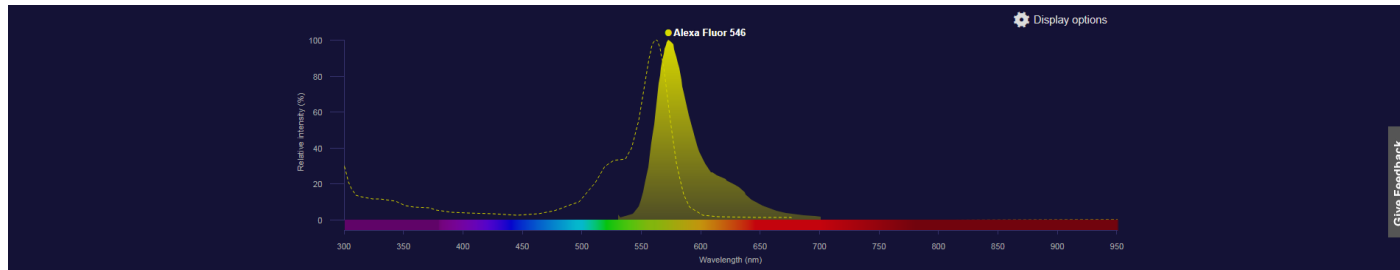
- Acquisition Mode: xyz
- Format: 1024 x 1024
- Speed: 600
- Bidirectional X: OFF
- Zoom Factor: 0.75
- Zoom in: OFF
- Image Size: 1.55 mm * 1.55 mm
- Pixel Size: 1.52 μm * 1.52 μm
- Optical Section: 12.848 μm
- Pixel Dwell Time: 400 ns
- Frame Rate: 0.194/s
- Line Average: 1
- Line Accu: 1
- Frame Average: 1
- Frame Accu: 1
- Pinhole: [dropdown]

The right panel is titled 'Configuration' and shows the following settings:

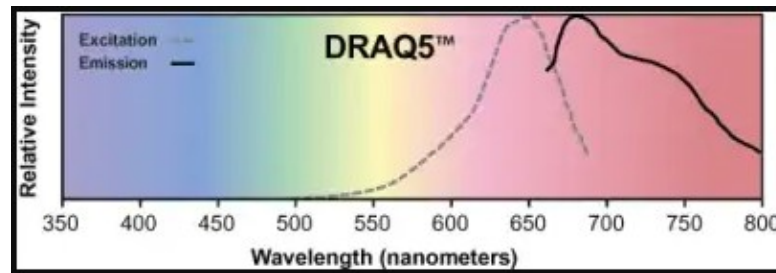
- Objective: HC PL FLUOTAR 10x/0.30 DRY
- Beamsplitter: TD 488/552/638
- Fluo Turret: Scan-BF
- Autoselect: ON
- Specimen: [dropdown]
- Internal: [dropdown]
- HyD 1: OFF, Gain [%]: 100.0
- PMT 2: ON, Gain [V]: 700.0, Offset [%]: 0.00
- HyD 3: OFF, Gain [%]: 100.0
- PMT 4: OFF, Gain [V]: 900.0, Offset [%]: 0.00
- TLD: [dropdown]
- PMT Trans: OFF, Gain [V]: 430.0, Offset [%]: 0.00

At the bottom of the interface, there are buttons for 'Autofocus', 'Live', 'Capture Image', and 'Start'.

- Dalším krokem je nastavení laserů, to se liší podle toho, jaké jsme použili sekundární protilátky – ty se totiž liší tím, jakou vlnovou délkou je můžeme excitovat
- Běžné používanými sekundárními protilátkami jsou protilátky konjugované s fluorescenční barvičkou (<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/antibodies/secondary-antibodies/fluorescent-secondary-antibodies.html>), např. Alexa Fluor (xx), kdy xx udává hodnotu vlnové délky záření, kterou je možné daný fluorofor excitovat
- v našem případě je to Alexa Fluor 546, takže máme-li na našem mikroskopu k dispozici lasery s vlnovou délkou 488, 552 a 638 nm, pak pro excitaci naší sekundární protilátky musíme použít laser 488 nm, který je schopen při vyšší intenzitě vybudit i tuto hodnotu



- Z excitačného/emisního spektra je patrné, že detektor emitovaného záření pak musíme nastavit na interval zhruba 550-650 nm
- Pro snímání fluorescence barvy všech jader DRAQ5 pak musíme použít laser s vln.délkou 638 nm a detektor do polohy 650-700 nm



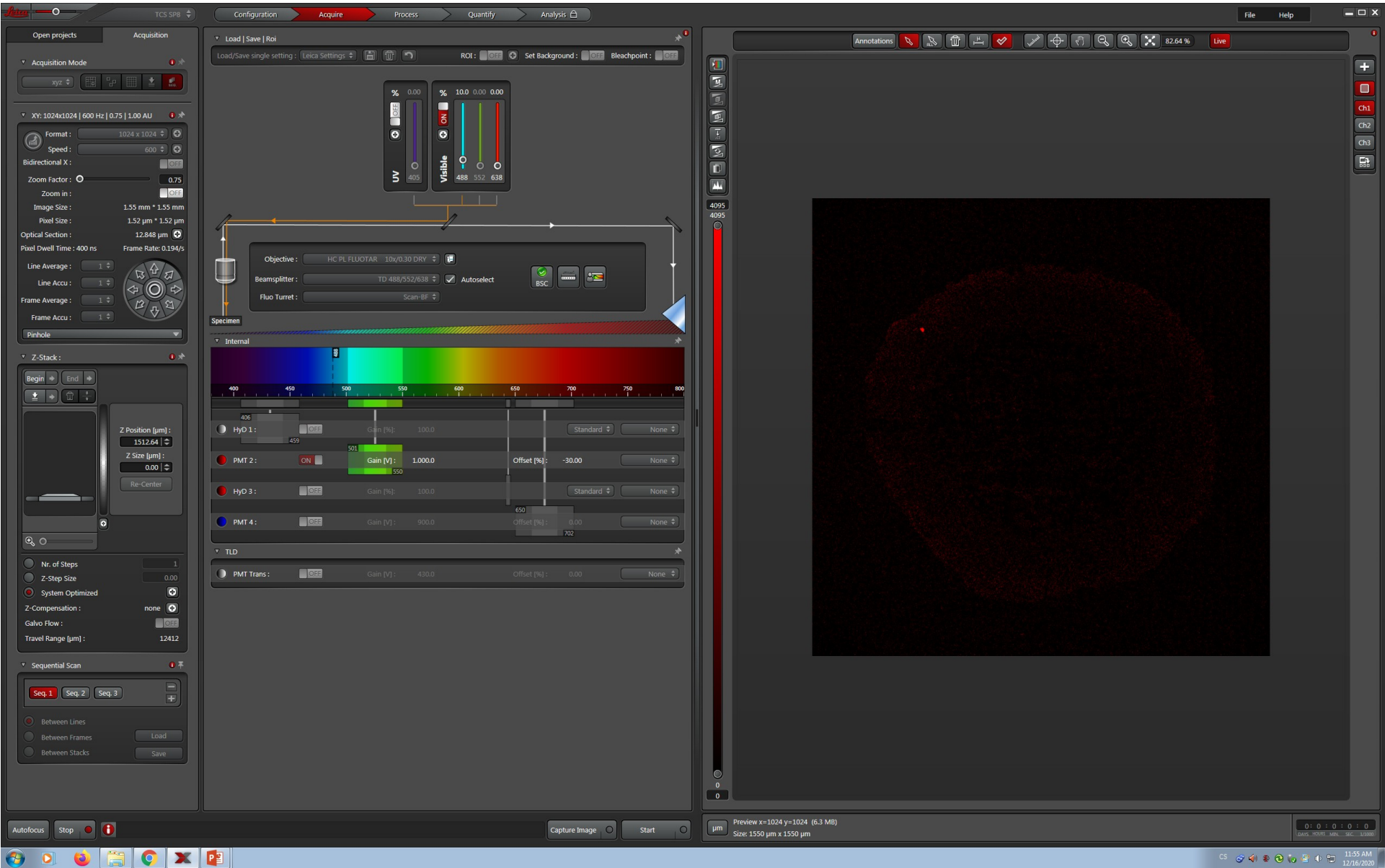
The screenshot shows the Leica software interface with several key sections:

- Configuration:** Includes 'Load | Save | Roi' and 'Load/Save single setting: Leica Settings'. It features intensity sliders for UV (405 nm) and Visible (488, 552, 638 nm) lasers.
- Acquisition Mode:** Shows parameters like XY: 1024x1024, 600 Hz, 0.75 | 1.00 AU, and various zoom and line average settings.
- Z-Stack:** Includes 'Begin', 'End', and 'Z Position [µm]: 1514.26'.
- Internal:** A spectral graph with a color scale from 400 to 800 nm. Below it, detector settings for HyD 1, PMT 2, HyD 3, and PMT 4 are listed with gain and offset values.
- TLD:** Shows 'PMT Trans' settings.
- Specimen:** A diagram of the optical path with objective and beamsplitter details.
- Image View:** A large grayscale image of a specimen with a blue arrow pointing to it from the detector settings.

Annotations in Czech:

- Top right: "Volba požadovaných laserů a nastavení intenzity laserů" (Selection of required lasers and laser intensity settings) with a blue arrow pointing to the laser intensity sliders.
- Bottom center: "Speciálním typem je transmisní detektor, který převede váš fluorescenční obrázek do podoby, jako když se koukáte do optického mikroskopu (vidíte vpravo)" (A special type is a transmission detector, which converts your fluorescence image into a form, as if you were looking through an optical microscope (see right)) with a blue arrow pointing to the detector settings.
- Bottom right: "Nastavení detektorů a jejich napětí" (Detector settings and their voltages) with a blue arrow pointing to the detector settings.

Takto pak vidíte, když snímáte pomocí laseru 488 nm – vidíte signál pro vaši protilátku, váš protein zájmu

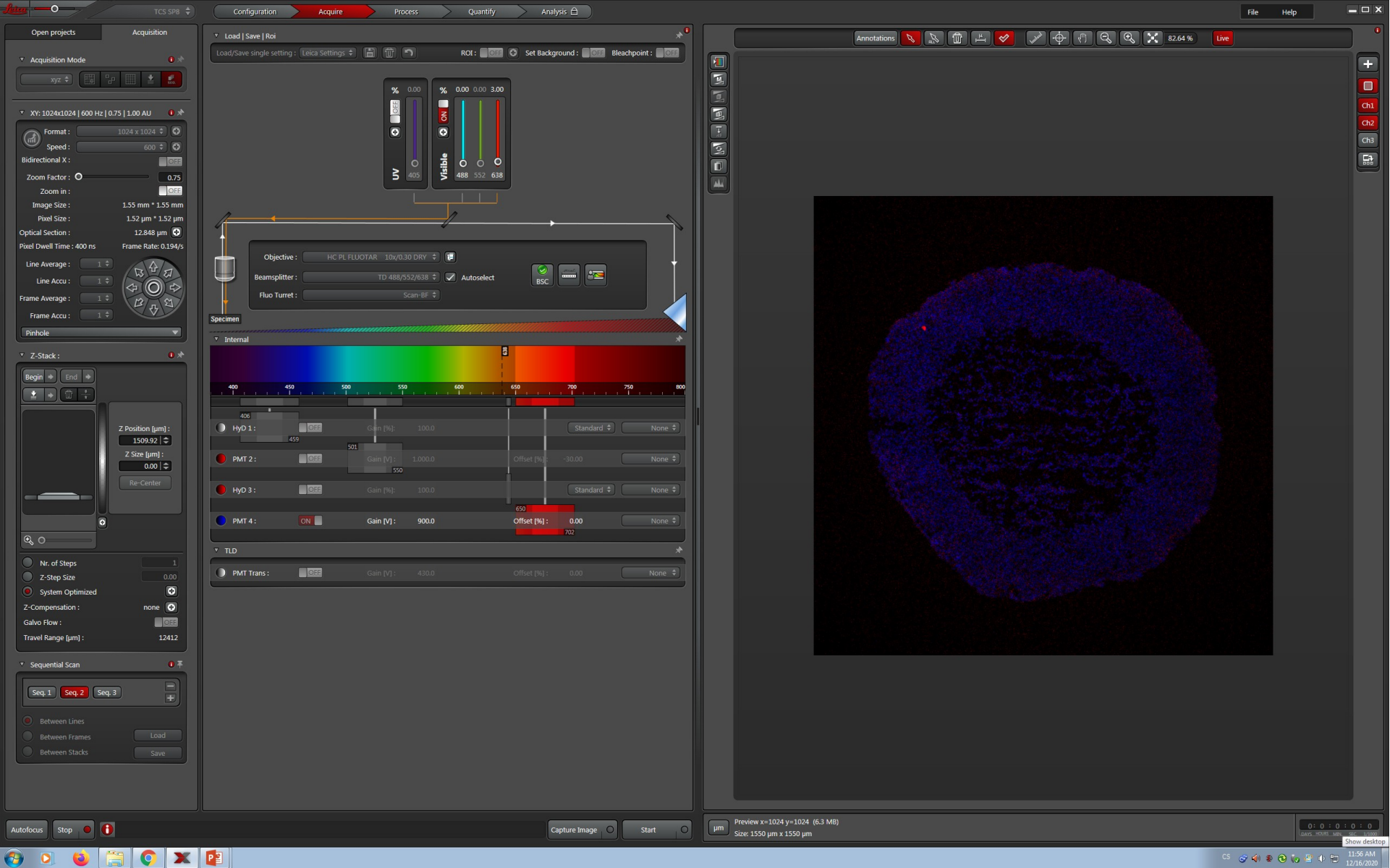


Takto vidíte, když snímáte pomocí laseru 638 nm – vidíte signál pro vaši všechna jádra (pro sferoidy je typické, že střed je tvořen mrtvými buňkami, je to tzv. nekrotické jádro a různé černé oblasti mohou vznikat i v důsledku mražení apod.)

The screenshot displays the Leica TCS SP8 software interface, which is divided into several functional areas:

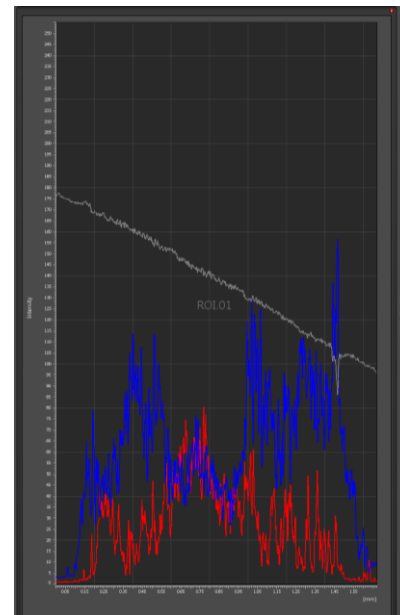
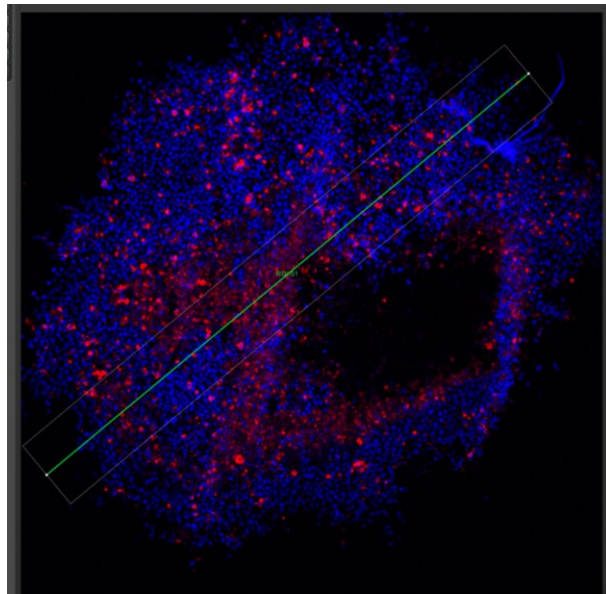
- Acquisition Panel (Left):** Contains settings for acquisition mode (xyz), format (1024 x 1024), speed (600), zoom factor (0.75), image size (1.55 mm x 1.55 mm), pixel size (1.52 μm x 1.52 μm), optical section (12.848 μm), and pixel dwell time (400 ns). It also includes Z-stack controls and sequential scan options.
- Configuration Panel (Top Center):** Shows the current acquisition settings, including the objective (HC PL FLUOTAR 10x/0.30 DRY), beamsplitter (TD 488/552/638), and fluo turret (Scan-BF).
- Internal Panel (Middle):** Displays a color scale from 400 to 800 nm and a list of channels with their respective gain and offset settings. The PMT 4 channel is currently set to ON with a gain of 900.0 and an offset of 0.00.
- Live Image (Right):** Shows a real-time fluorescence image of a spheroid, which appears as a dark blue, textured circular structure. The image is displayed at 82.64% zoom.
- Bottom Panel:** Includes controls for autofocus, stop, capture image, and start, along with a status bar showing the preview size (1550 μm x 1550 μm) and the current date and time (11:56 AM 12/16/2020).

Takto pak vidíte, když se signály z obou laserů překryjí, vidíte tedy celou plochu sferoidu (modře) a v ní distribuci vašeho proteinu (červeně)



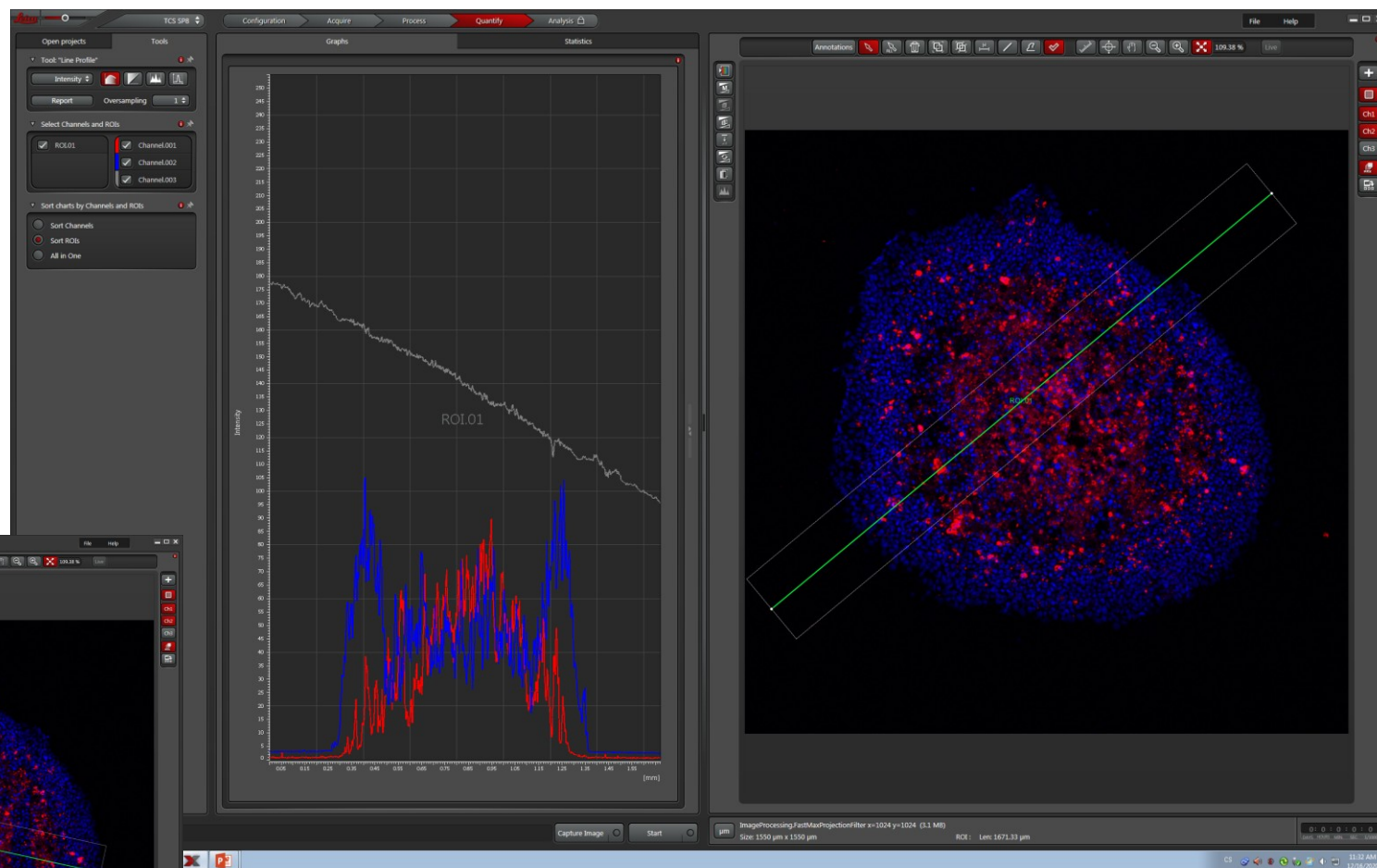
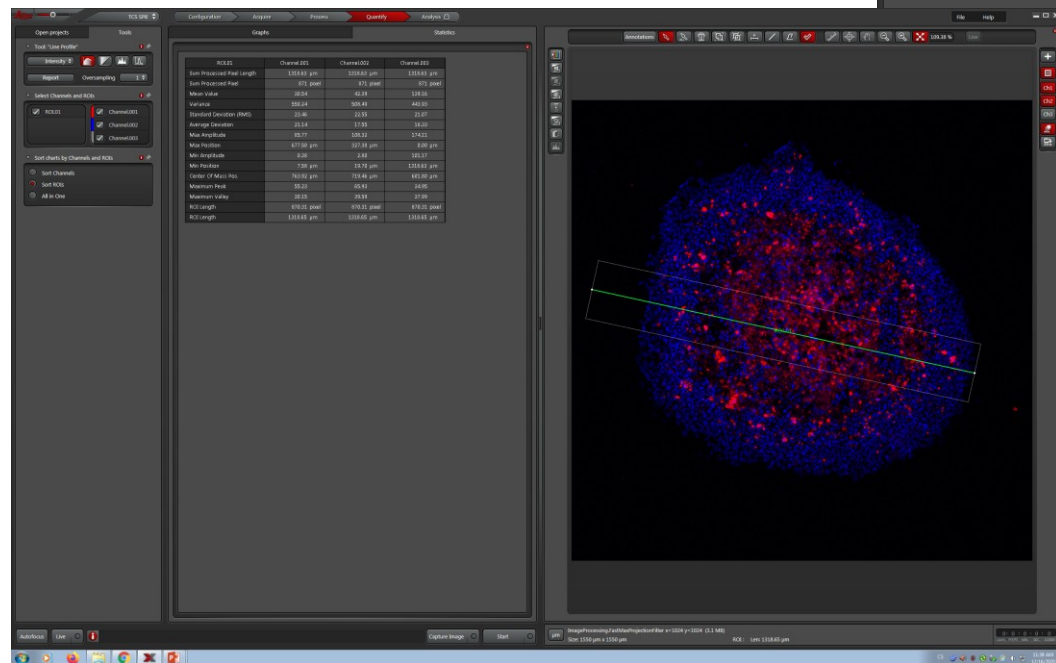
Tak, tolik k úvodu, tyhle slidy byly pro vás, abyste trochu věděli, o čem je řeč a jak ten hezky barevný obrázek vzniká, nic z toho nemusíte v prezentaci komentovat. Teď přejdeme k vašim výsledkům a ty už budou součástí prezentace.

Na jednotlivých slidech uvidíte nasnímané řezy sféroidem, kde se distribuce signálů pro Ki67 (proliferace) a štěpené kaspázy 8 (apoptóza) liší v závislosti na treatmentu. Pro zjištění této distribuce byla použita „ROI“ = region of interest, vidíte jakou zelenou úsečku, a signály z této oblasti jsou převedeny do grafu a popsány pomocí průměrné hodnoty signálu v tabulce. **Zajímá nás, jak se mění poměr intenzity červeného kanálu (channel001 – váš protein) ku intenzitě modrého kanálu (channel002 – všechna jádra).** Pro tyto potřeby máte vyexportované výsledky pro všechna snímání, vidíte obrázek sféroidu, graf popisující jednotlivé intenzity a také tabulku s číselnými hodnotami (mean value). Tabulku si budete muset hodně zvětšit, ale měli byste to přečíst. Vypočtené poměry mezi sebou porovnáte a budete usuzovat na to, co vám to o distribuci proteinu říká – zda jeho exprese v daném místě roste nebo klesá a co tím pádem způsobil/nezpůsobil váš treatment.

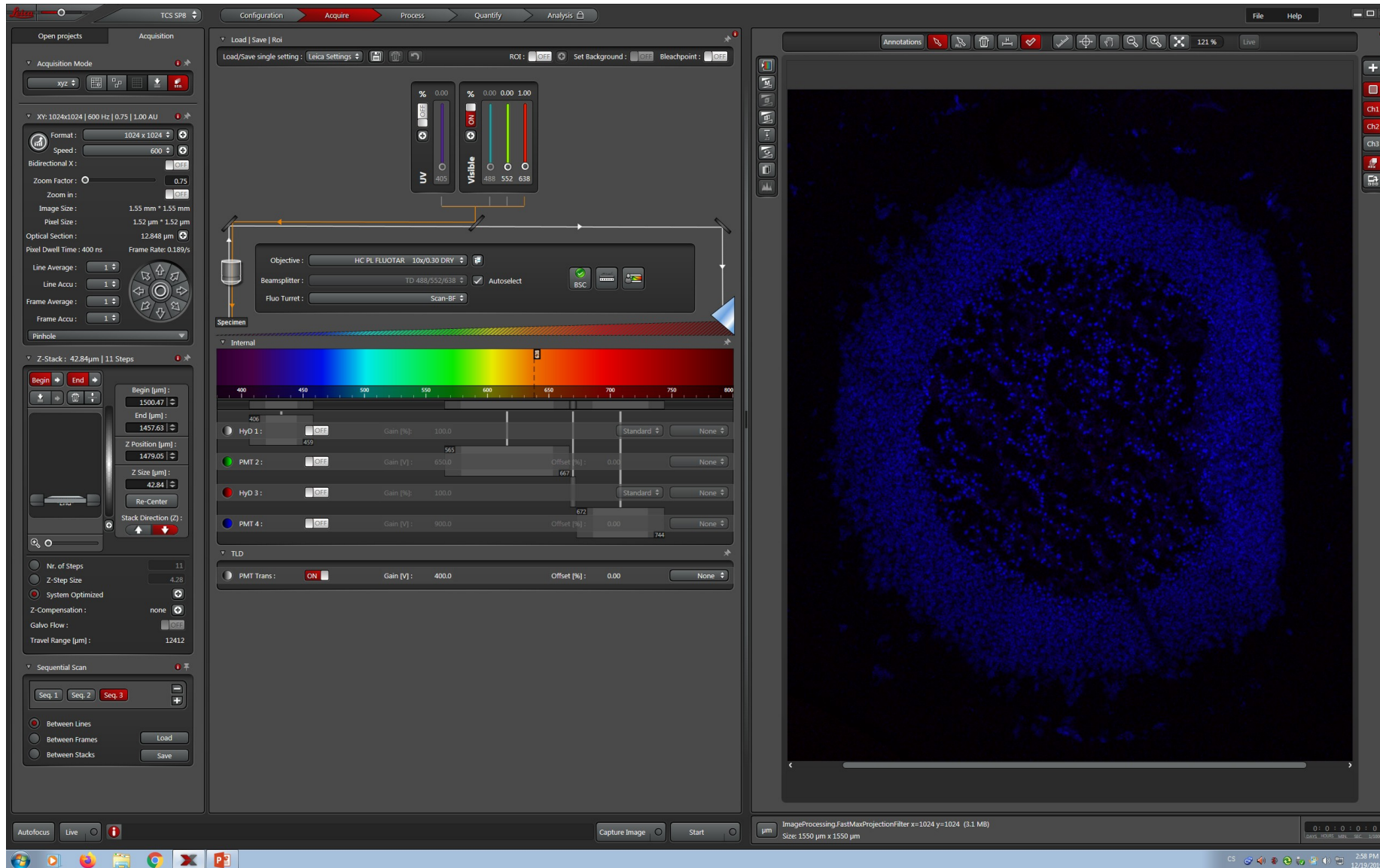


ROI.01	Channel.001	Channel.002	Channel.003
Sum Processed Pixel Length	1671.32 μm	1671.32 μm	1671.32 μm
Sum Processed Pixel	1 kpixel	1 kpixel	1 kpixel
Mean Value	23.86	58.75	138.05
Variance	350.87	877.89	392.24
Standard Deviation (RMS)	18.19	29.63	24.34
Average Deviation	15.32	23.74	21.04
Max Amplitude	80.70	156.47	177.90
Max Position	771.26 μm	1466.76 μm	0.00 μm
Min Amplitude	0.55	2.96	85.99
Min Position	28.79 μm	24.24 μm	1466.76 μm
Center Of Mass Pos.	810.21 μm	900.79 μm	750.84 μm
Maximum Peak	56.84	97.72	39.84
Maximum Valley	23.31	55.80	52.06
ROI Length	1.10 kpixel	1.10 kpixel	1.10 kpixel
ROI Length	1671.33 μm	1671.33 μm	1671.33 μm

Štěpená kaspáza 8 – kontrola

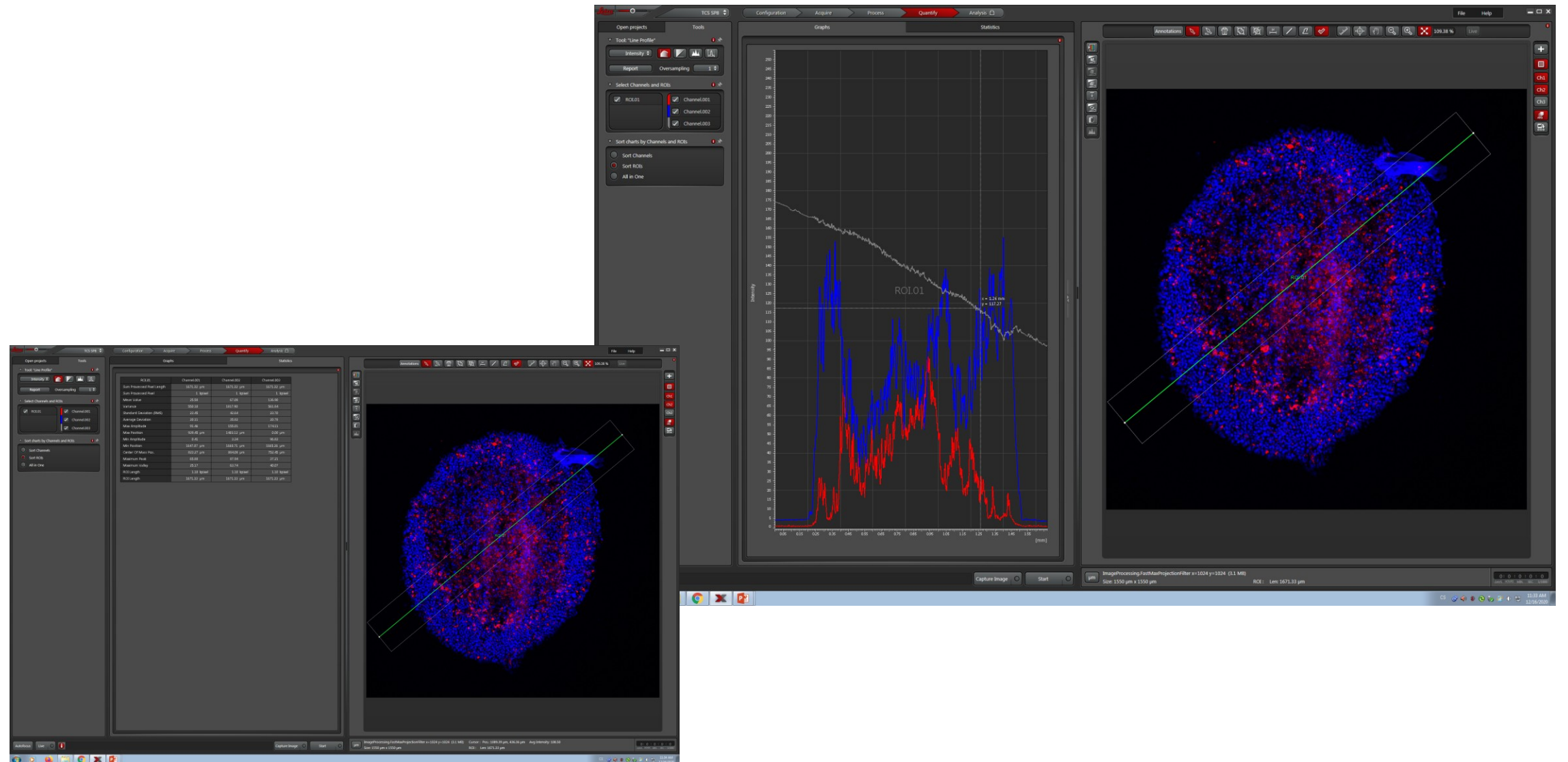


Sekundární protilátka, která byla nanese na řez bez primární protilátky – můžete v ppt zmínit jen to, že jsme nastavení laserů ověřili a zabránili tak snímání nespecifického signálu pro naši protilátku

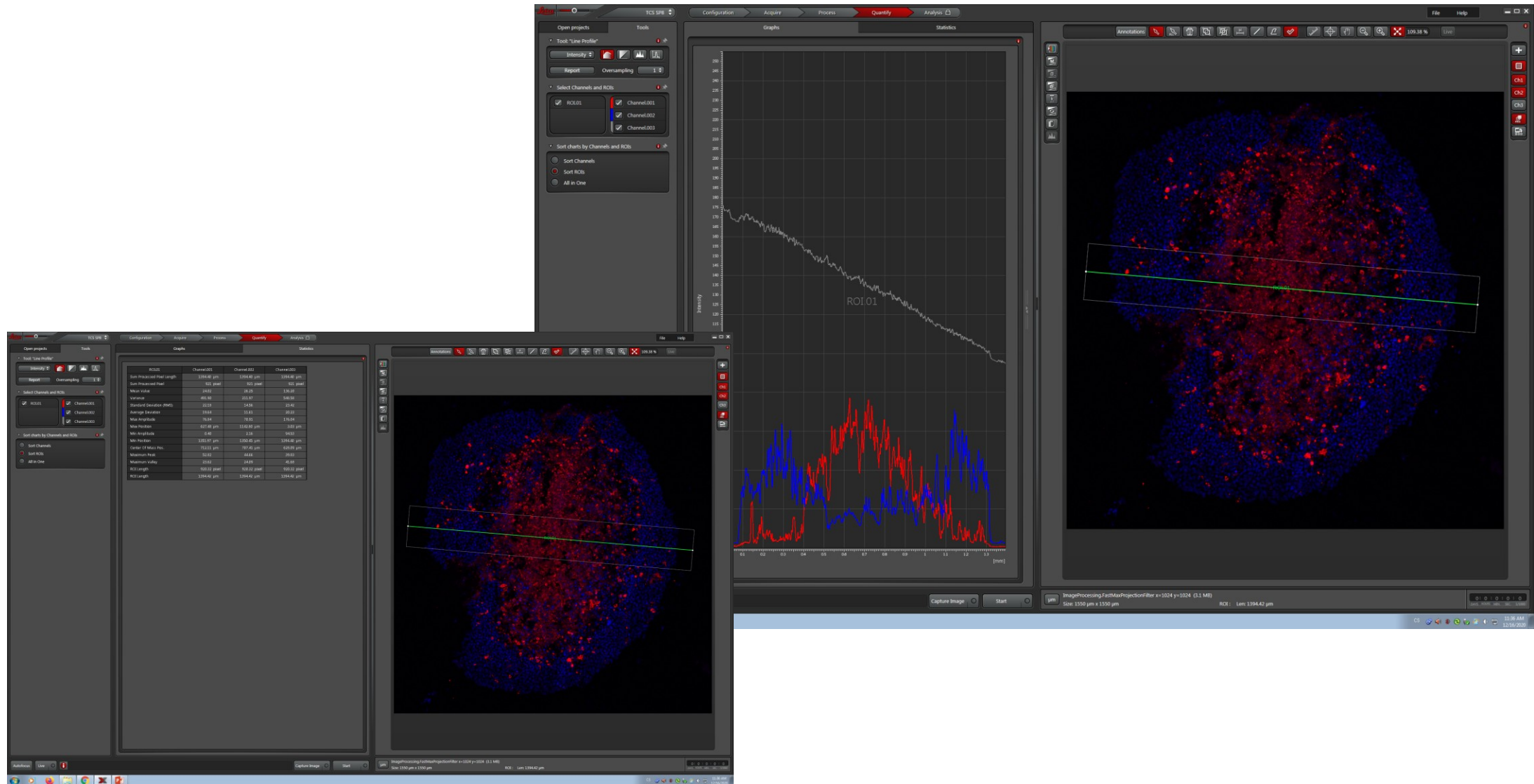


Pokud na některém grafu vidíte i channel003, je to proto, že jsme snímali transmisi, ale číselný údaj k ničemu nepotřebujete, tak jen abyste nebyli kvůli tomu zmatení 😊

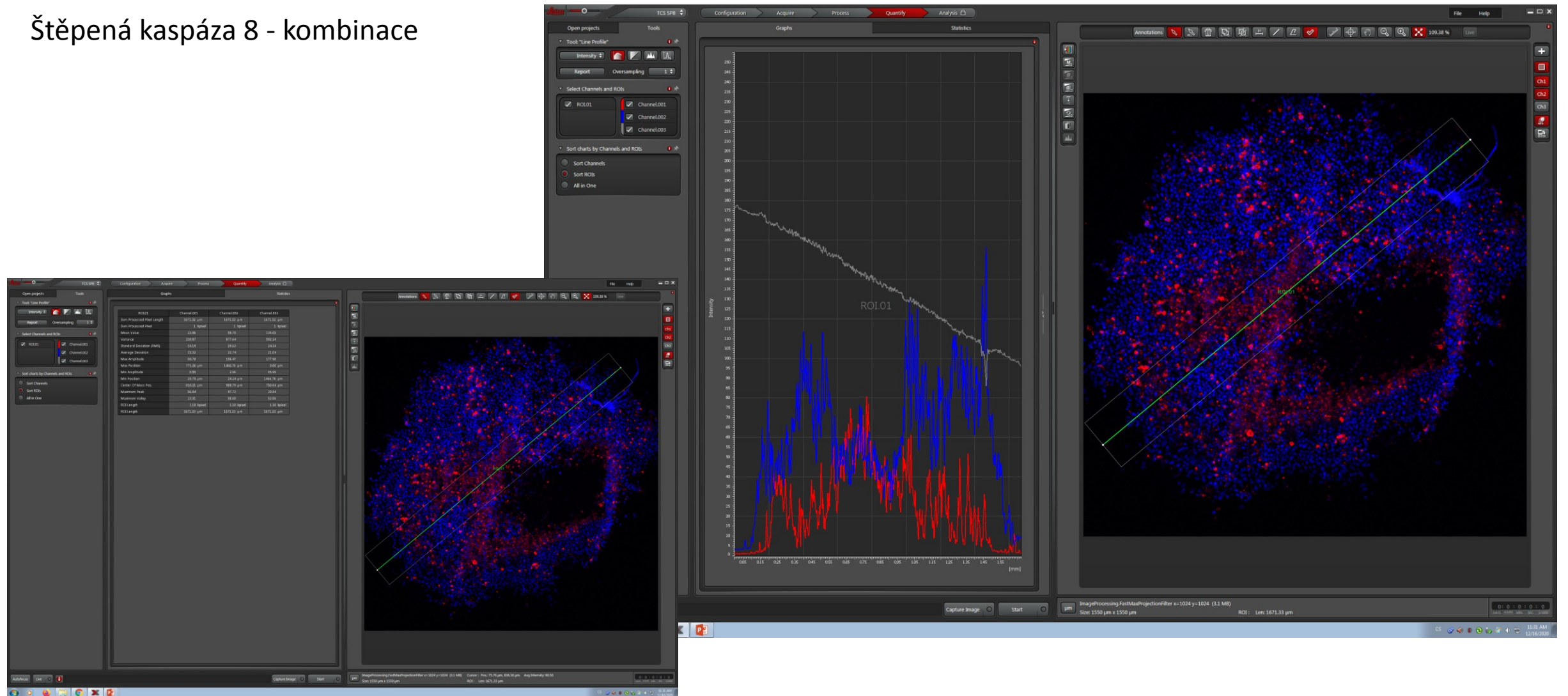
Štěpená kaspáza 8 - perifosin



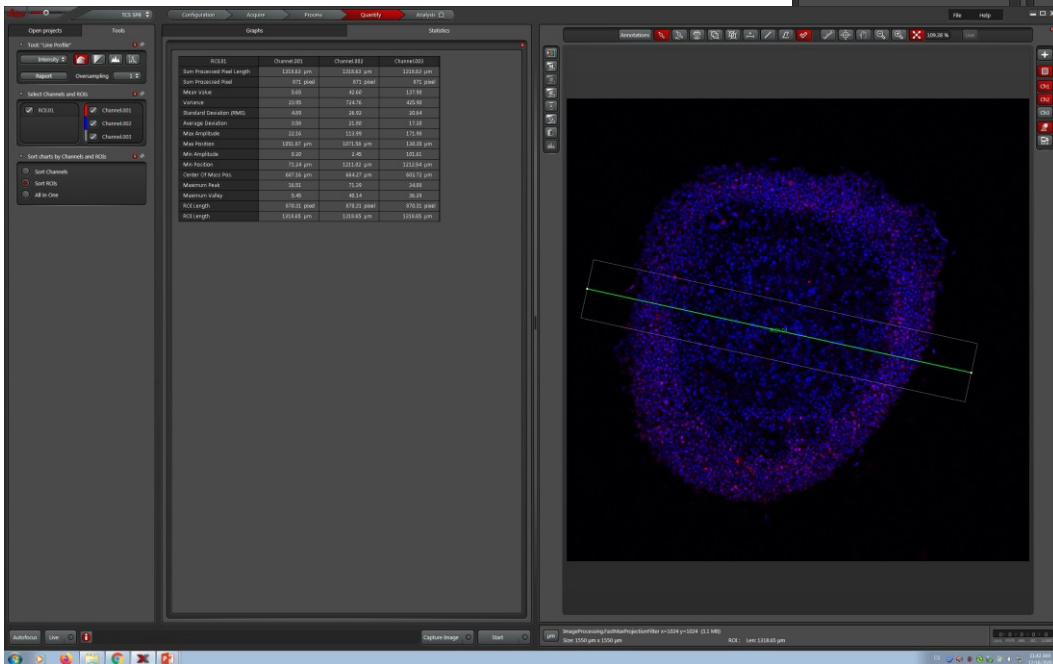
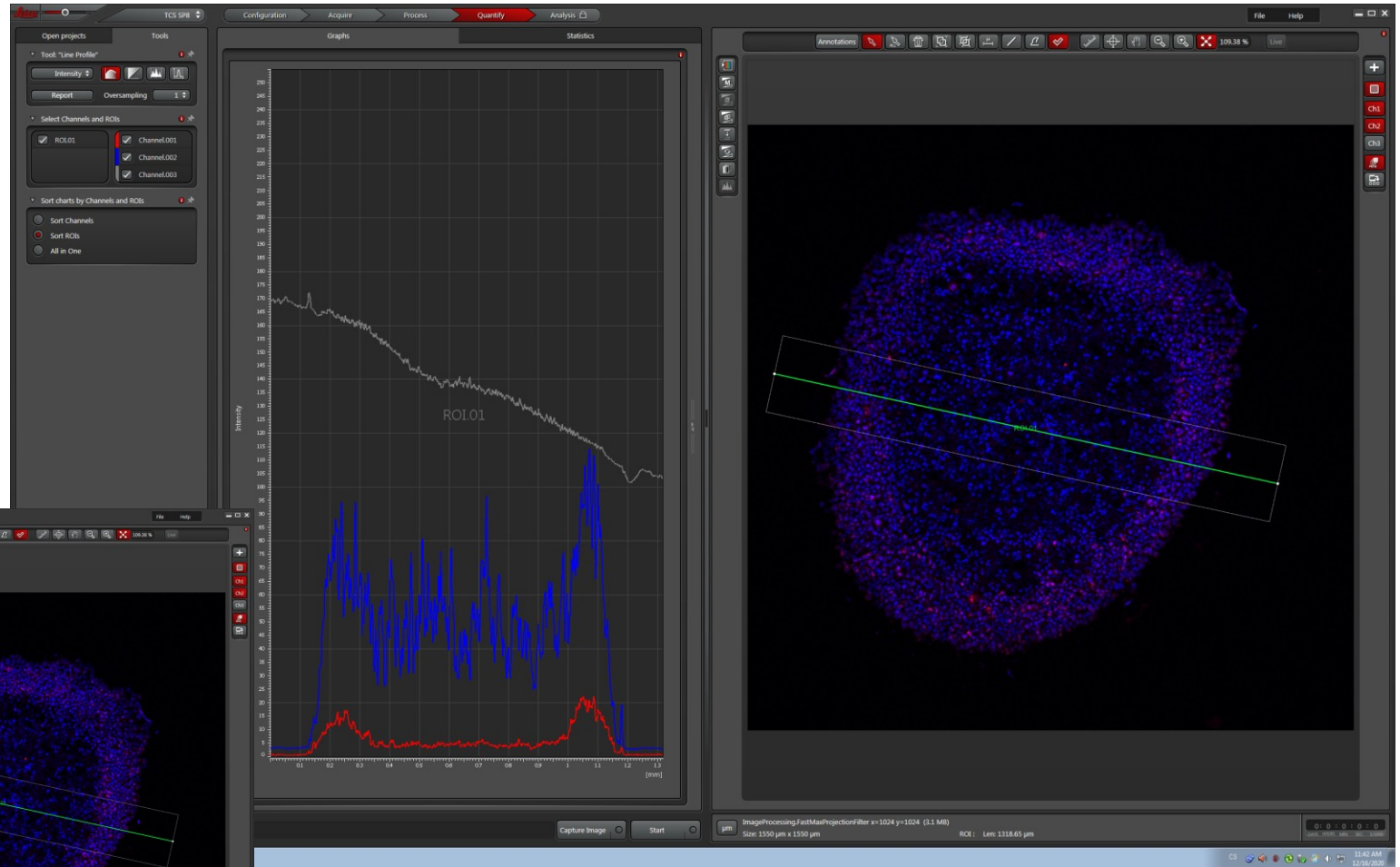
Štěpená kaspáza 8 – NaHCO₃



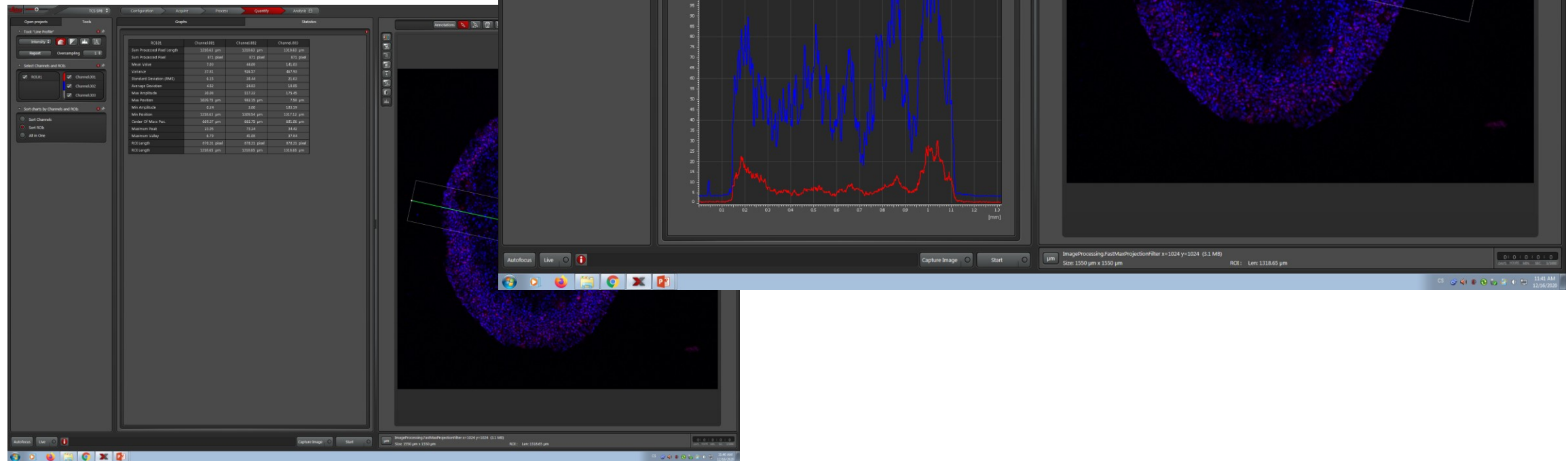
Štěpená kaspáza 8 - kombinace



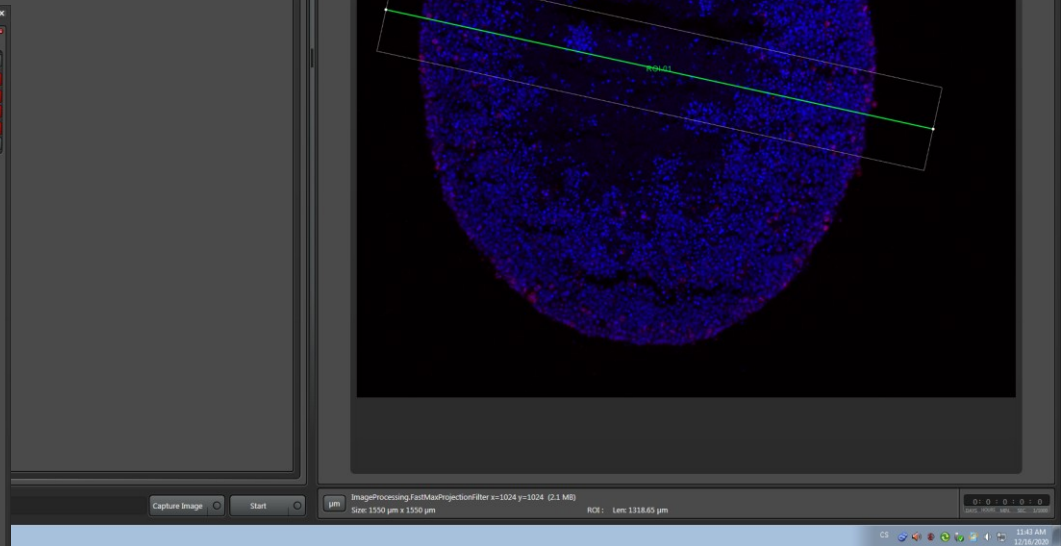
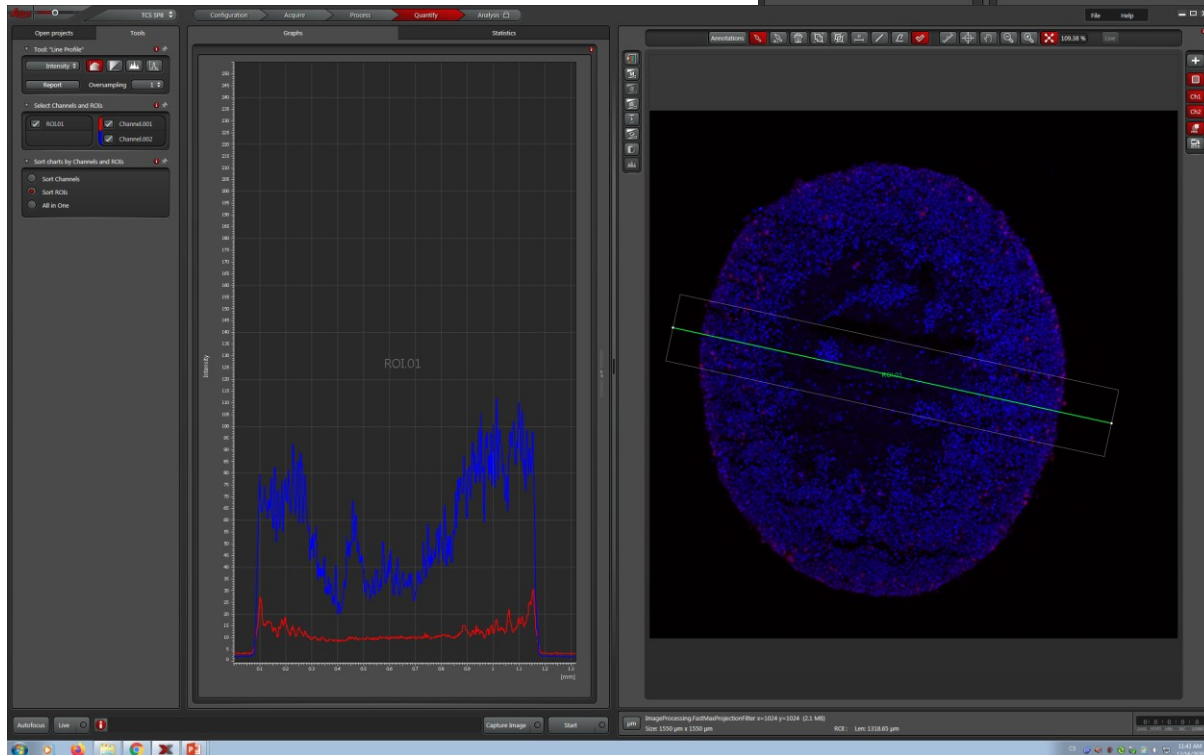
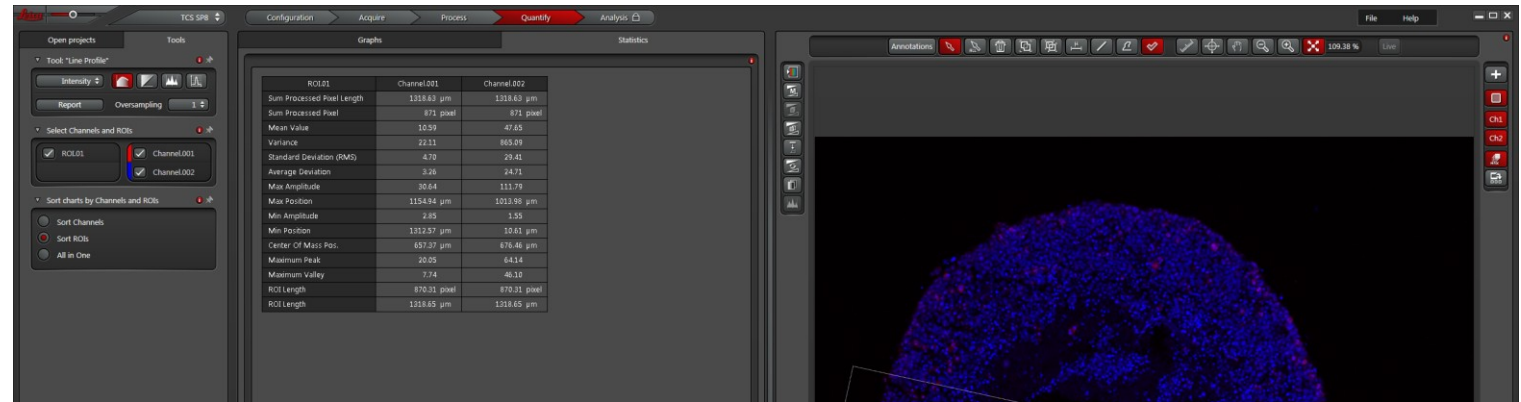
Ki67 – kontrola



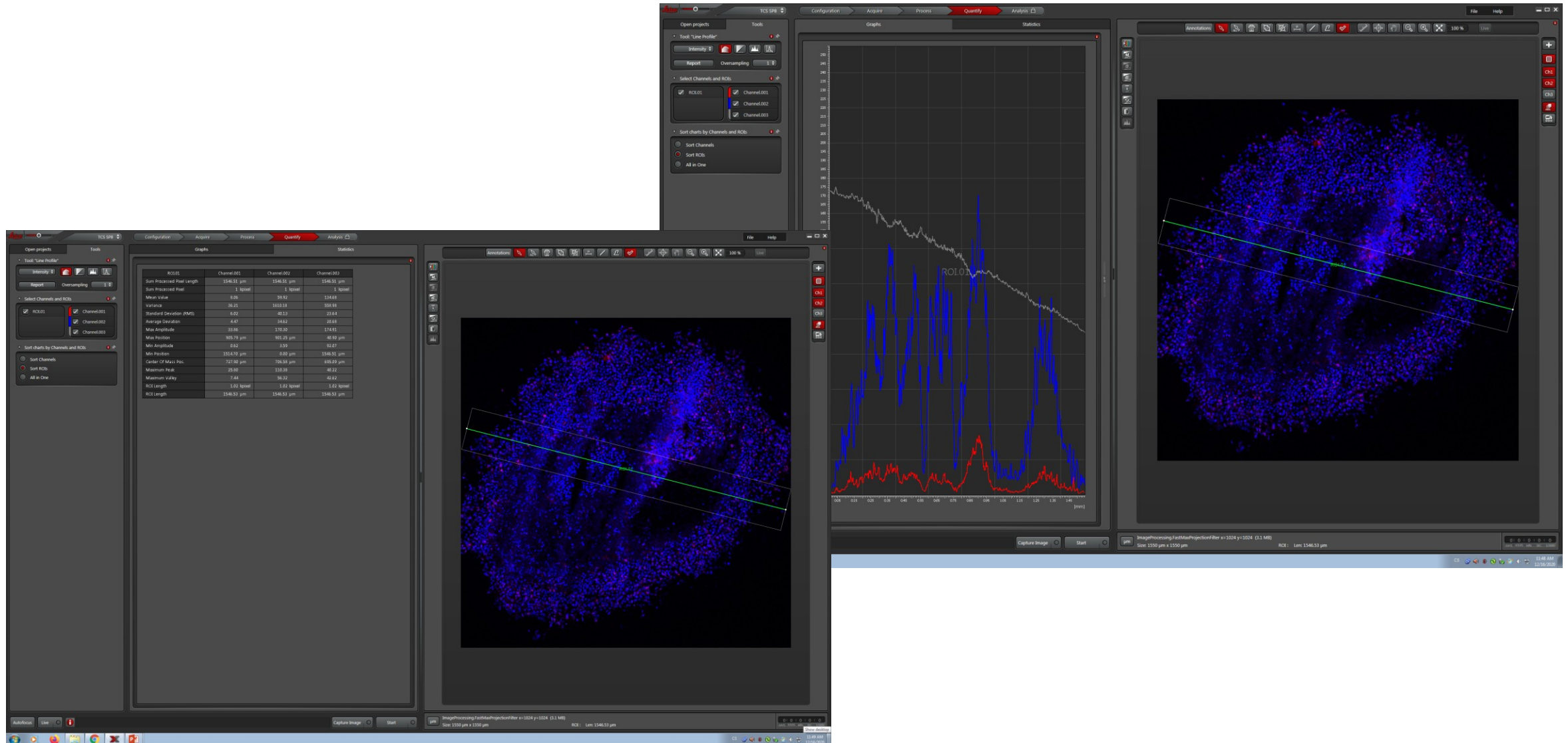
Ki67 – perifosin



Ki67 – NaHCO3



Ki67 – kombinace



Do prezentace zahrňte obrázky sféroidů a poměr, který vypočtete se slovním komentářem, jak jste k tomu všemu došli a co to znamená. 😊

