

Inovace předmětu KBB/MIK

SVĚTELNÁ A ELEKTRONOVÁ

MIKROSKOPIE

Rozvoj a internacionalizace chemických
a biologických studijních programů na
Univerzitě Palackého v Olomouci

CZ.1.07/2.2.00/28.0066



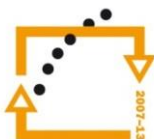
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Konfokální mikroskopie a Superrozlišovací mikroskopie

Konfokální mikroskopie

„Confocal Microscopy“

Rozmach optické mikroskopie v posledních letech (konec 20. a začátek 21. století)

- **vysoká kvalita nových objektivů navrhovaných počítači**
- **spojení mikroskopů s vyspělou videotechnikou**
- **technologické pokroky ve vývoji laserů, polovodičových detektorů světla (CCD kamer) a počítačů**
- **automatizace mikroskopu**
(zahrnuje motorizaci: revolverové hlavy, kondenzoru, osvětlení, fluorescenčního osvětlovače, nosičů filtrů, zaostřování)

Konfokální mikroskopie

U preparátů **silných nad 20 μm** je prudce snížen obrazový kontrast potlačením jemných strukturálních detailů nacházejících se mimo zaostřenou rovinu → **rušivé zamlžení obrazu**. Tento problém řeší **konfokální mikroskopie**.

1957 – patent na princip konfokálního mikroskopu Marvin Minski



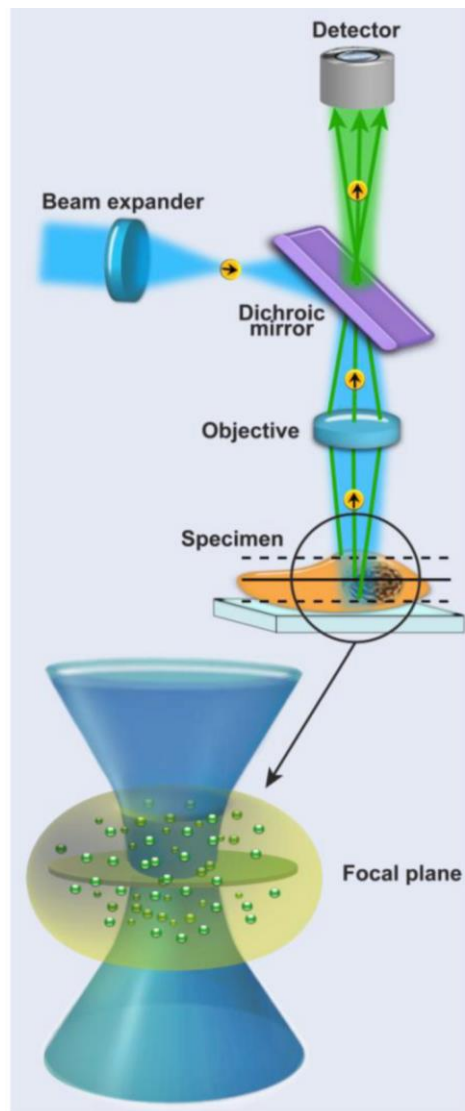
Rozvoj – konec 70. let (podíl i českých vědců, Mojmír Petráň a Milan Hadravský – 1968 patent konfokálního mikroskopu na principu rotujícího Nipkowova disku)

Konfokální mikroskopie

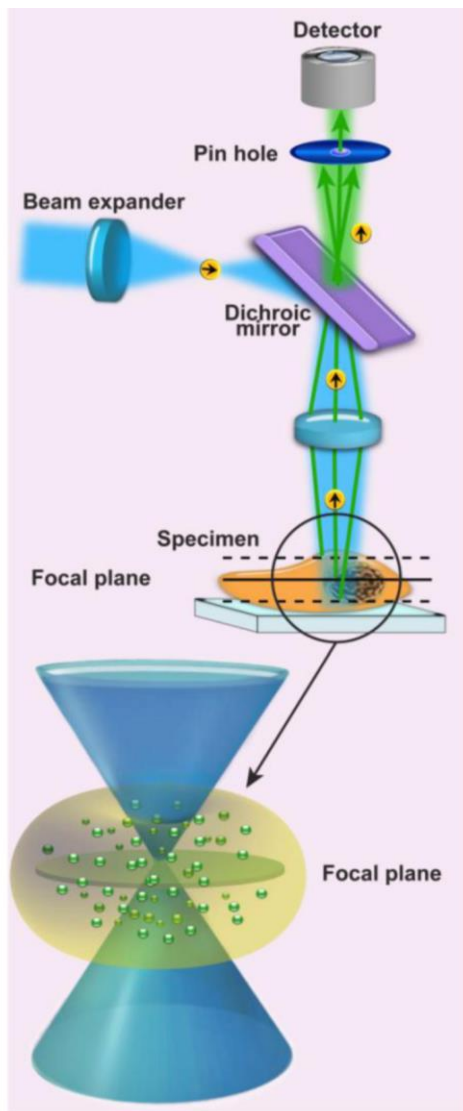
- umožňuje sledování objektů v jedné optické rovině
- využití **konfokální clony („pinhole“)** – umožňuje přechod záření pocházejícího ze zaostřené roviny v preparátu. Záření z oblastí ležících mimo rovinu zaostření konfokální clonou neprochází
- emitované záření dopadá do **fotonásobiče** a následně do **detektoru**, nebo je snímáno pomocí **citlivé kamery**
- preparát je skenován pomocí **laseru** (zdroj záření)
- široké použití **fluorescenčních proteinů**, ale i vhodně zvolených **fluorescenčních barviv**
- plně **motorizovaný pohyb** preparátu (osy x, y, z)

Fluorescenční vs. konfokální mikroskop

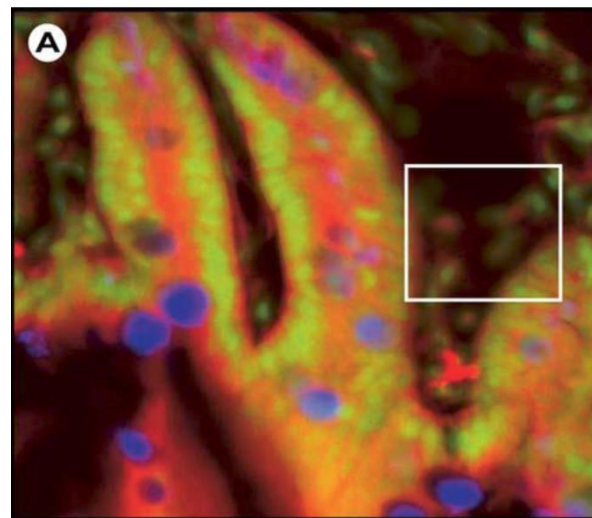
FLUORESCENČNÍ MIKROSKOP



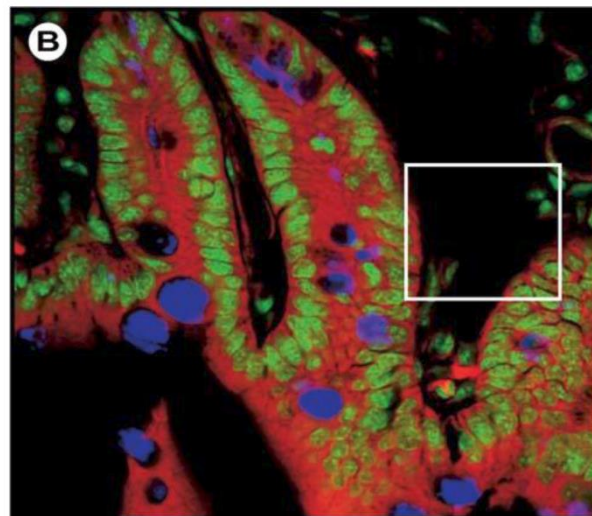
KONFOKÁLNÍ MIKROSKOP



FLUORESCENČNÍ MIKROSKOP



KONFOKÁLNÍ MIKROSKOP



Konfokální mikroskop

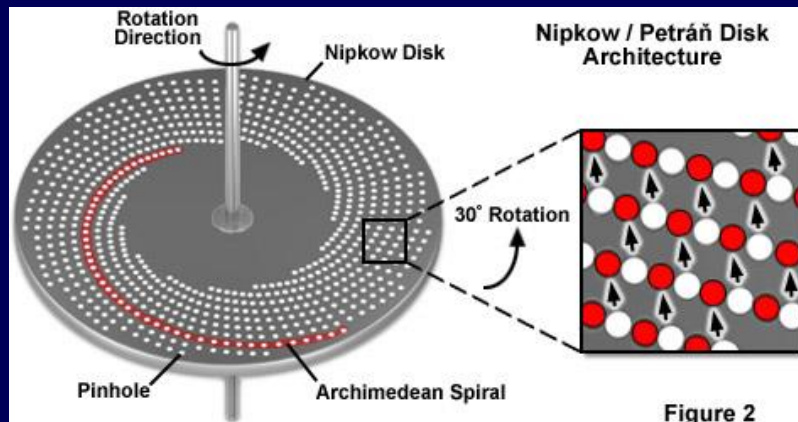
Mechanismus skenování preparátu:

- **využití rotujícího Nipkowova disku**
Tandem Scanning Confocal Microscope – TSCM, nebo
Spinning Disc Confocal Microscope – SDCM
- **pomocí kmitajícího laserového paprsku**
Confocal Laser Scanning Microscope – CLSM, nebo
Laser Scanning Confocal Microscope – LSCM

Nipkowův disk v konfokální mikroskopii

1884 - německý technik Paul Nipkow

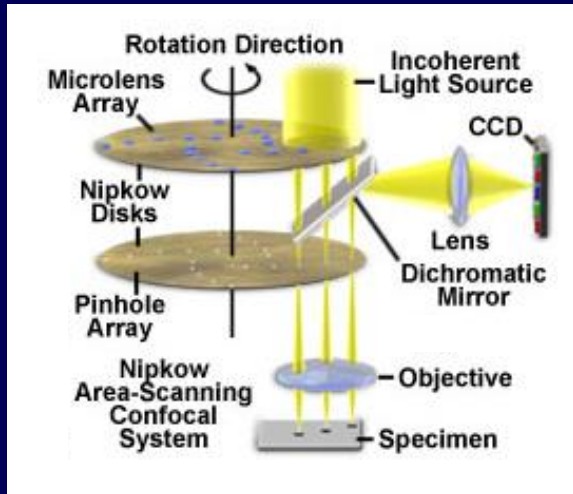
- mechanické zařízení, rychle rotující perforovaná destička, na které je mnoho vzájemně oddělených clonek („pinhole“) uspořádaných v spirále a přes kterou je světlo zaměřováno na studovaný objekt
- umožňuje zobrazovat několik bodů preparátu najednou
- rychlé snímání, nižší intenzita světla k osvětlení preparátu
- metoda vhodná pro pozorování rychlých dějů v živých buňkách



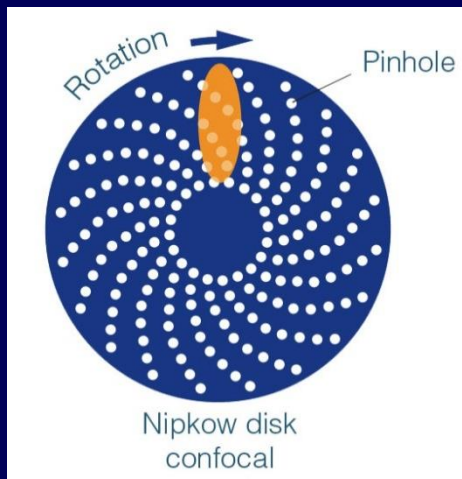
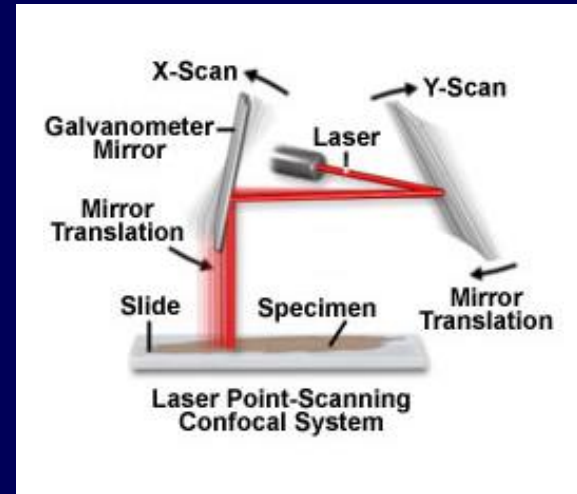
Nipkowův disk

Principy skenování u konfokálních mikroskopů

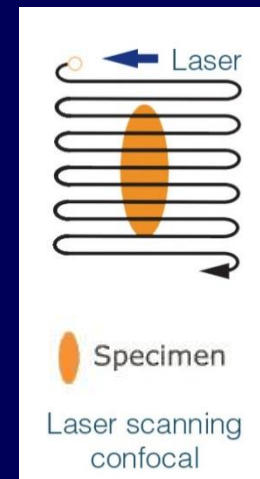
TSCM



CLSM



**Rychlost
skenování:
30 snímků/s**



**Rychlost
skenování:
3 snímky/s
(skenování bod
po bodu)**

Konfokální mikroskop

Zdroj záření - laser

- obvykle soubor laserů o přesně definovaných vlnových délkách, tak aby pokryli celé vlnové spektrum, např.:

blízký UV (diodový) – 405 nm

modrý (Ar) – 457, 488, 515 nm

zelený (He-Ne) – 543 nm

červený (He-Ne) – 633 nm



Diodový laser



Ar laser

Konfokální mikroskop

Detekční zařízení

- u TSCM je celé zorné pole snímáno pomocí **citlivé vysokorychlostní kamery**
- v případě CLSM fotony emitovány z preparátu dopadají do **fotonásobiče**, kde dochází k emisi elektronů a jejich následnému znásobování. Elektrony jsou posléze detekovány **detektorem**, intenzita signálu závisí od počtu dopadajících elektronů



Kamera Andor iXon Ultra

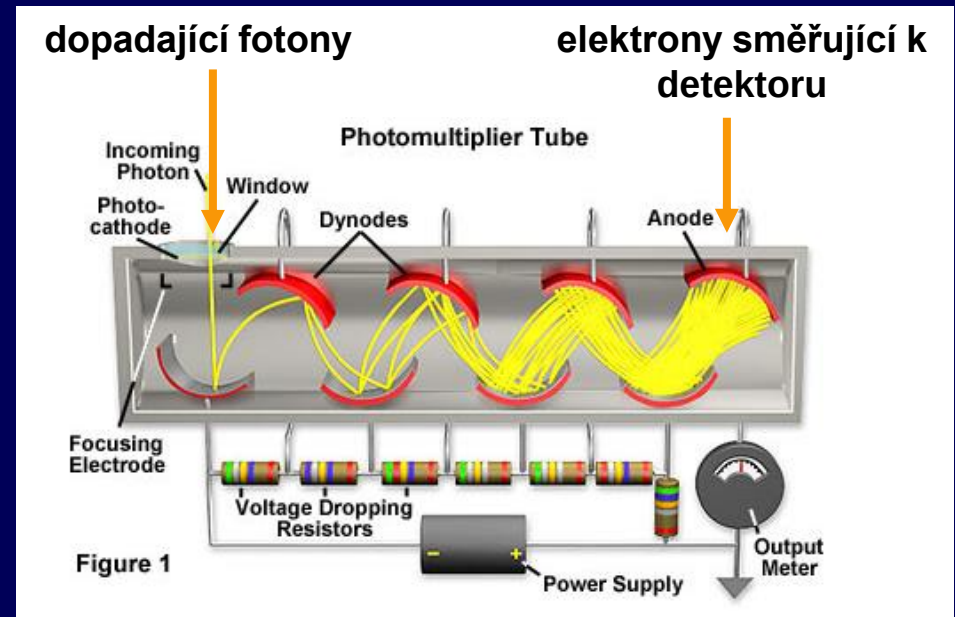


Schéma fotonásobiče

Konfokální mikroskop

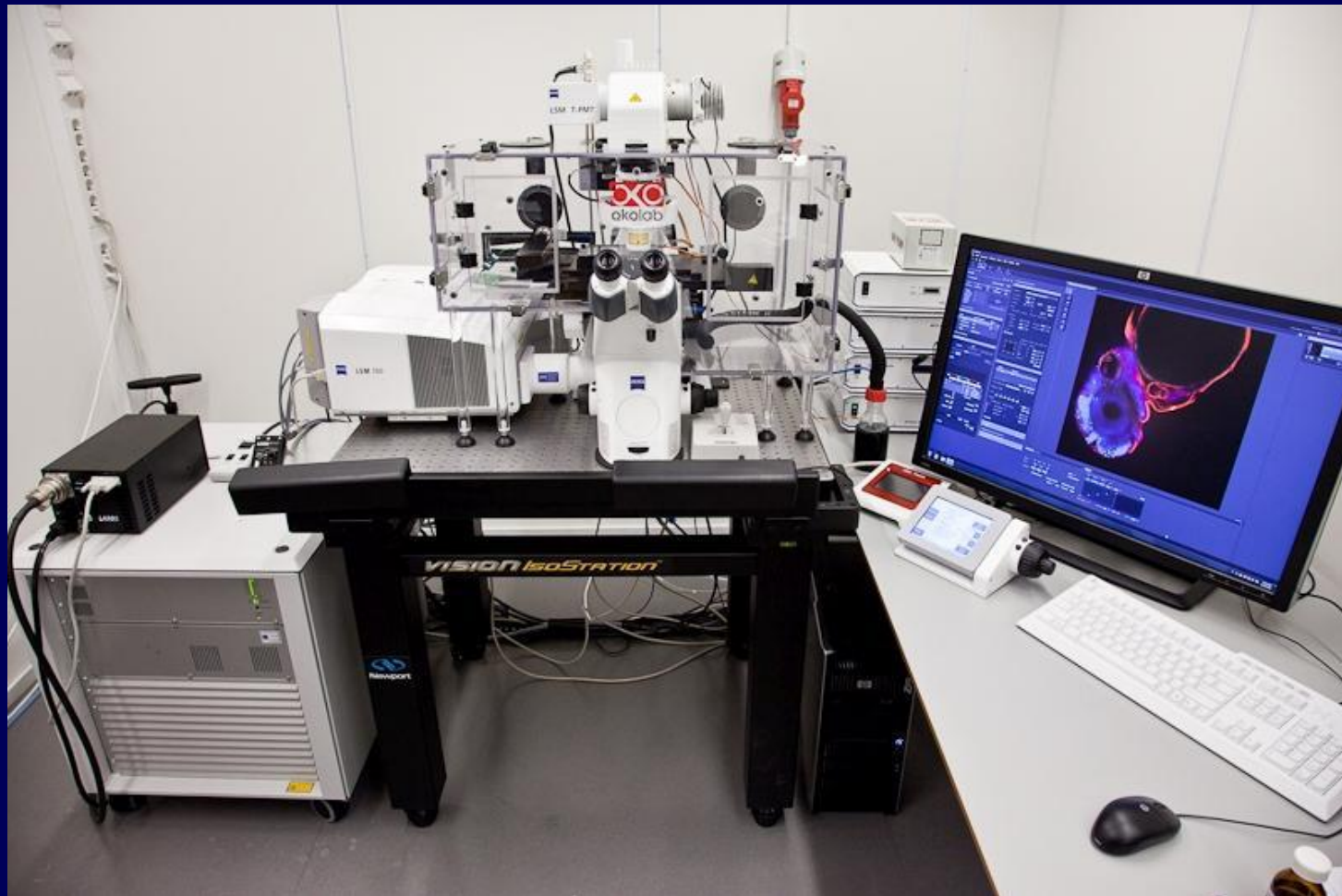


Olympus FluoView 1000

Zeiss LSM 700



Konfokální mikroskop



Zeiss LSM 780

Konfokální mikroskopie

Výhody:

- umožňuje pozorování živých objektů v reálném čase
- obraz neobsahuje neostré pozadí z oblastí vzorku ležících mimo rovinu zaostření
- postupným snímáním při plynule se měnící hloubce zaostření (posun v ose z) získáme sérii desítek optických řezů → zásobník 2D obrazů (tloušťka optického řezu při NA obj. = 1,3 je cca 0,4 μm)
- přídatným softwarem možnost získání prostorových 3D obrazů
- vyšší rozlišovací schopnost oproti klasickému mikroskopu (1,4x vyšší při stejné NA obj., obraz vzniká skládáním z jednotlivých bodů pozorovaných přes clonku, body bývají menší než průměr Airyho kroužků)

Nevýhody:

- zatíženost statistickým šumem, který nelze snadno řešit zvýšením intenzity záření

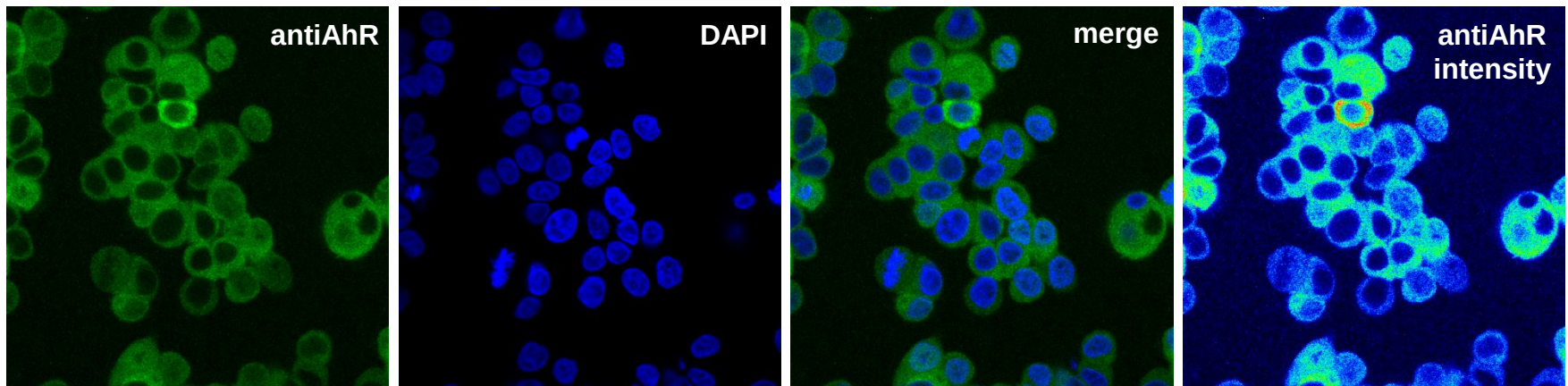
Konfokální mikroskopie

Využití:

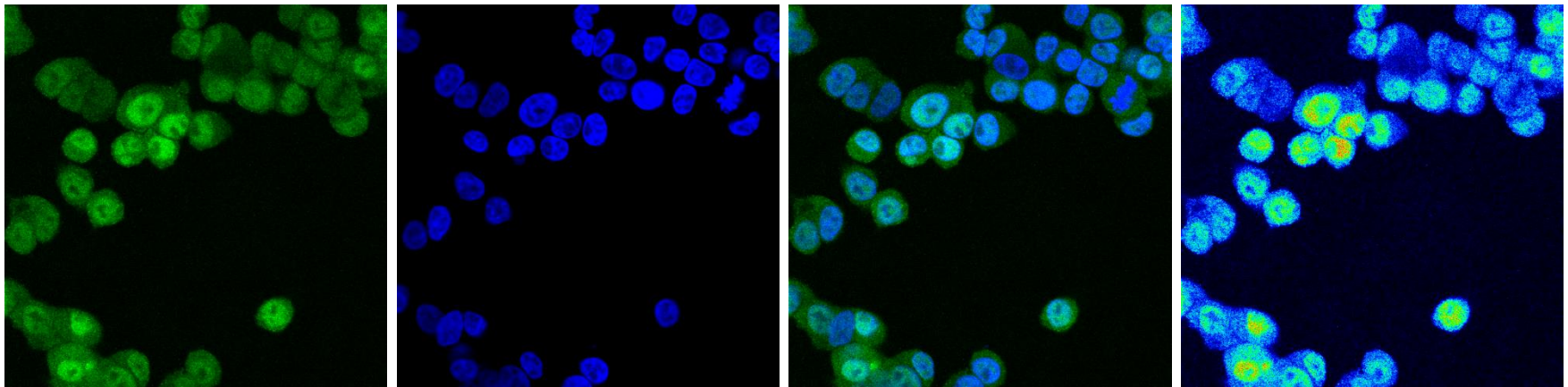
- v buněčné biologii a fyziologii:
- **tenké optické řezy** buňkami nebo tkáněmi (pletivy)
 - sledování **polohy a rozmístění** jednotlivých struktur a komponent (lokalizace)
 - určení jejich **vzájemné polohy** (kolokalizace) s využitím vícenásobného barvení
- **časové série** zaznamenávající časové změny (včetně velmi rychlých dynamických procesů – použití SDCM)
 - sledování **dynamiky proteinů a organel**
 - sledování **transportních procesů** (trafficking) v reálném čase
 - sledování **změn některých fyziologických parametrů** (pH, koncentrace různých iontů)
 - data pro **kvantitativní analýzu** dynamických procesů
- **série optických řezů v ose z („z-stack“)**
 - studium **trojrozměrné struktury objektů**

Vícenásobné barvení – kolokalizace

control



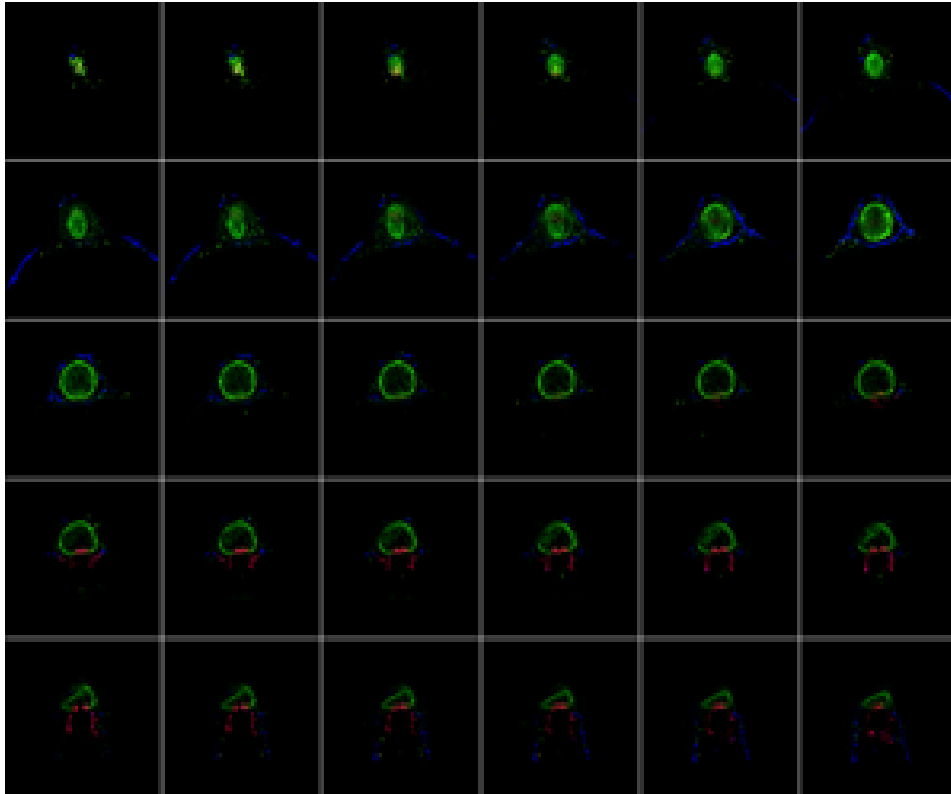
TCDD



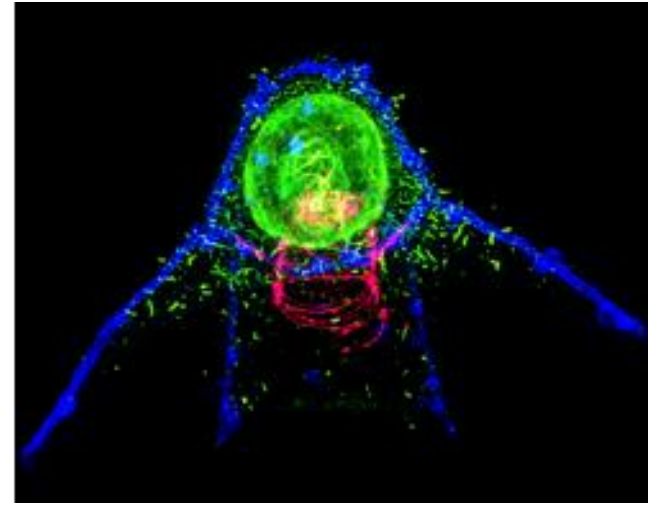
Fluorescence intensity 0  4095

Série optických řezů v ose z – 3D rekonstrukce

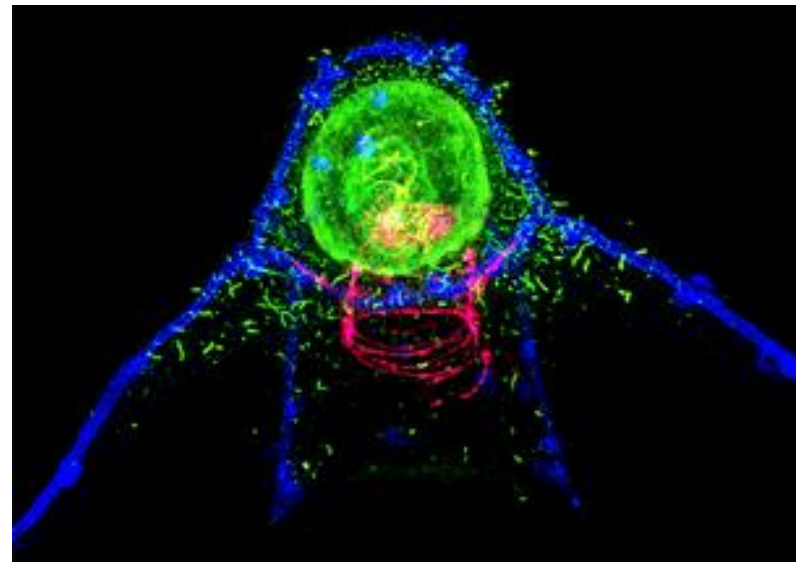
Série optických řezů „z-stack“



„Maximum intensity projection“



3D rekonstrukce



Doporučené www adresy

Konfokální mikroskopie z <http://microscopy.duke.edu/>

<http://microscopy.duke.edu/learn/introtomicroscopy/confocals.html>

<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/>

Glossary of Terms in Confocal Microscopy

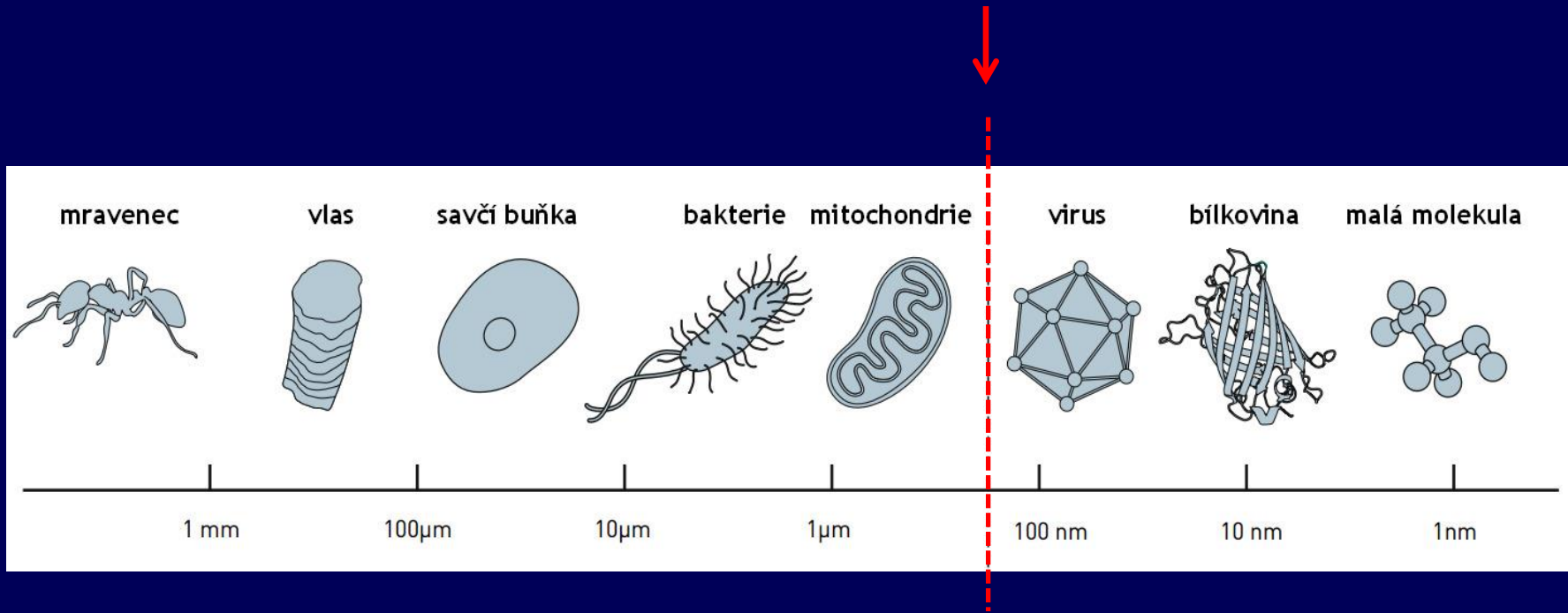
<http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/techniques/confocal/glossary.html>

Superrozlišovací mikroskopie

„Super-resolution Microscopy“

Rozlišení optické mikroskopie je kvůli difrakčnímu limitu omezené – cca 250 nm

Abbého difrakční limit (0,2 μm)



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

Nevýhody EM:

- 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 superrezoluce:

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

Nobelova cena za chemii* pro rok 2014



Američané **Eric Betzig** a **William Moerner** a Němec **Stefan Hell**

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

(prolomení více než stoletého dogmatu o tom, že cokoliv menší než zhruba polovina vlnové délky světla ($0,2 \mu\text{m}$) nelze opticky pozorovat)

*NC 2014 za chemii - důmyslné využití fotochemických nebo fotofyzikálních vlastností fluorochromů

Přehled superrozlišovacích metod

Konfokální zobrazování

STED - STimulated Emission Depletion

4Pi mikroskopie

Celoplošné zobrazování („wide-field“)

Mikroskopie se strukturovaným osvětlením:

SIM - Structured Illumination Microscopy

Lokalizační mikroskopie (stochastická lokalizace):

STORM - Stochastic Optical Reconstruction Microscopy

PALM - Photoactivation Localization Microscopy

FPALM - Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy

GSDIM - Ground State Depletion followed by Individual Molecule return

STED

(Stimulated Emission Depletion)



Leica TCS SP8 STED

STED

(STimulated Emission Depletion)

= redukce fluorescence stimulovanou emisí - fluorescenční mikroskopie umožňující dosáhnout rozlišení vyšší (50 nm), než je klasická mez ($0,61 \cdot \lambda / NA_{\text{obj}}$ – tj. asi 250 nm).

Princip metody:

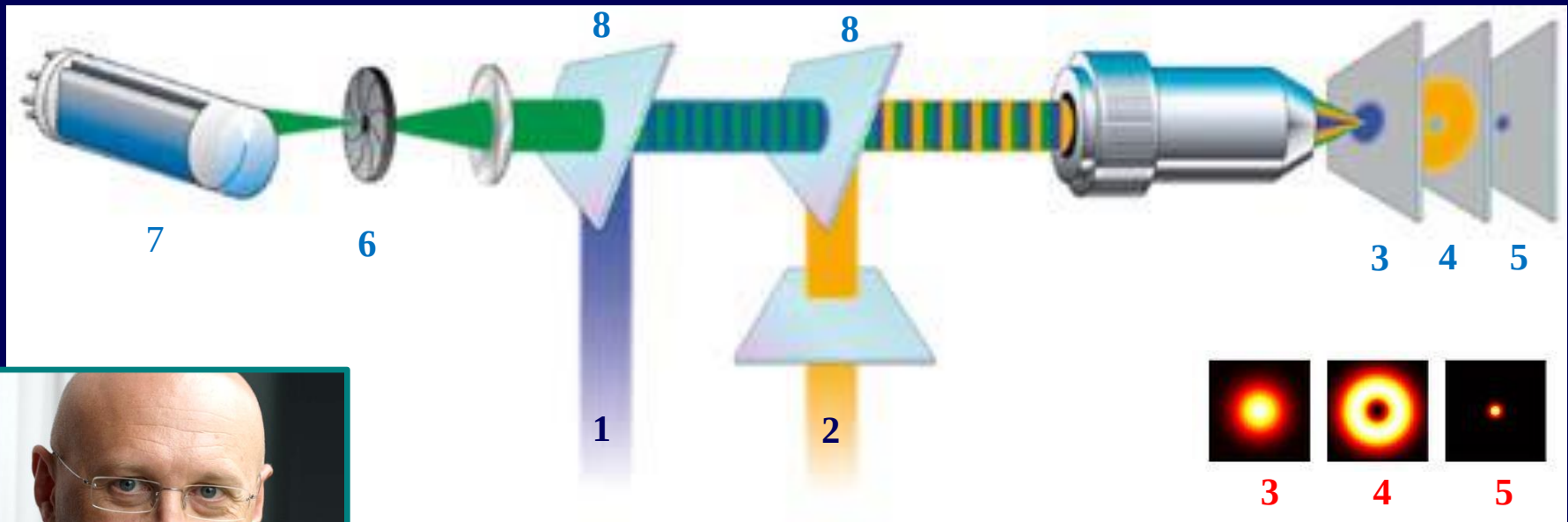
- tlumení fluorescence excitovaných molekul v okrajových částech stopy skenujícího laserového svazku pomocí dvou časově synchronizovaných a prostorově koincidujících (souosých) laserových pulsů:

první (excitační) – provádí excitaci fluorochromů

druhý (STED puls) – delší vlnová délka jako excitační puls; v okrajových částech tlumí emisi vyvolanou excitačním pulsem a to tzv. stimulovanou emisí (dojde k „vyčerpání energie“ z fluorochromu)

- k tlumení emise dochází v okrajových částech stopy excitačního svazku, její střed však není tlumen → podstatné zmenšení fluorescenční stopy, a tím výrazné zvýšení rozlišení

Princip mikroskopie STED u mikroskopu Leica TCS SP5 STED



Profesor Stefan W. Hell
(německý fyzik)
Nobelova cena za rok 2014

- 1** – paprsek budicího laseru (excitační záření)
- 2** – paprsek deplečního laseru (záření o delší λ)
- 3** – původní excitační kroužek (klasický konfokální)
- 4** – depleční (STED) kroužek
- 5** – **výsledný excitační bod** (menší než 90 nm)
- 6** – konfokální clona
- 7** – detektor
- 8** – dichroické zrcadla

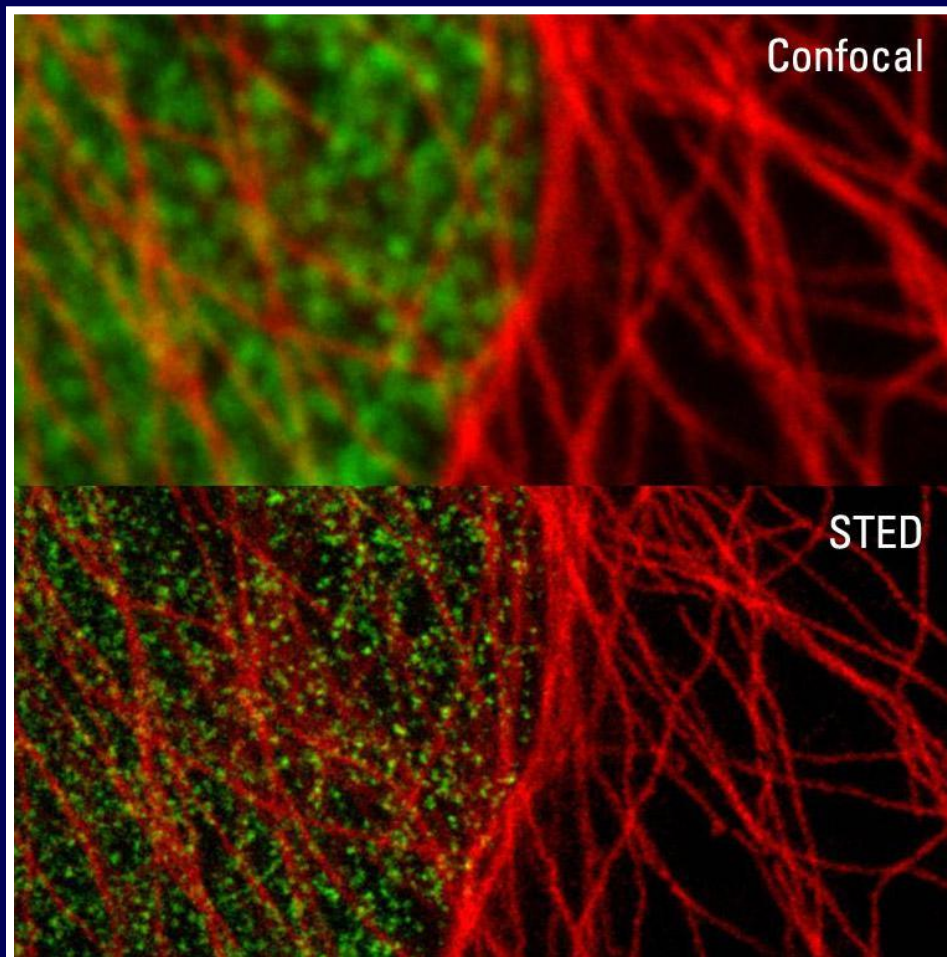
STED (STimulated Emission Depletion)

= stimulované potlačení emise

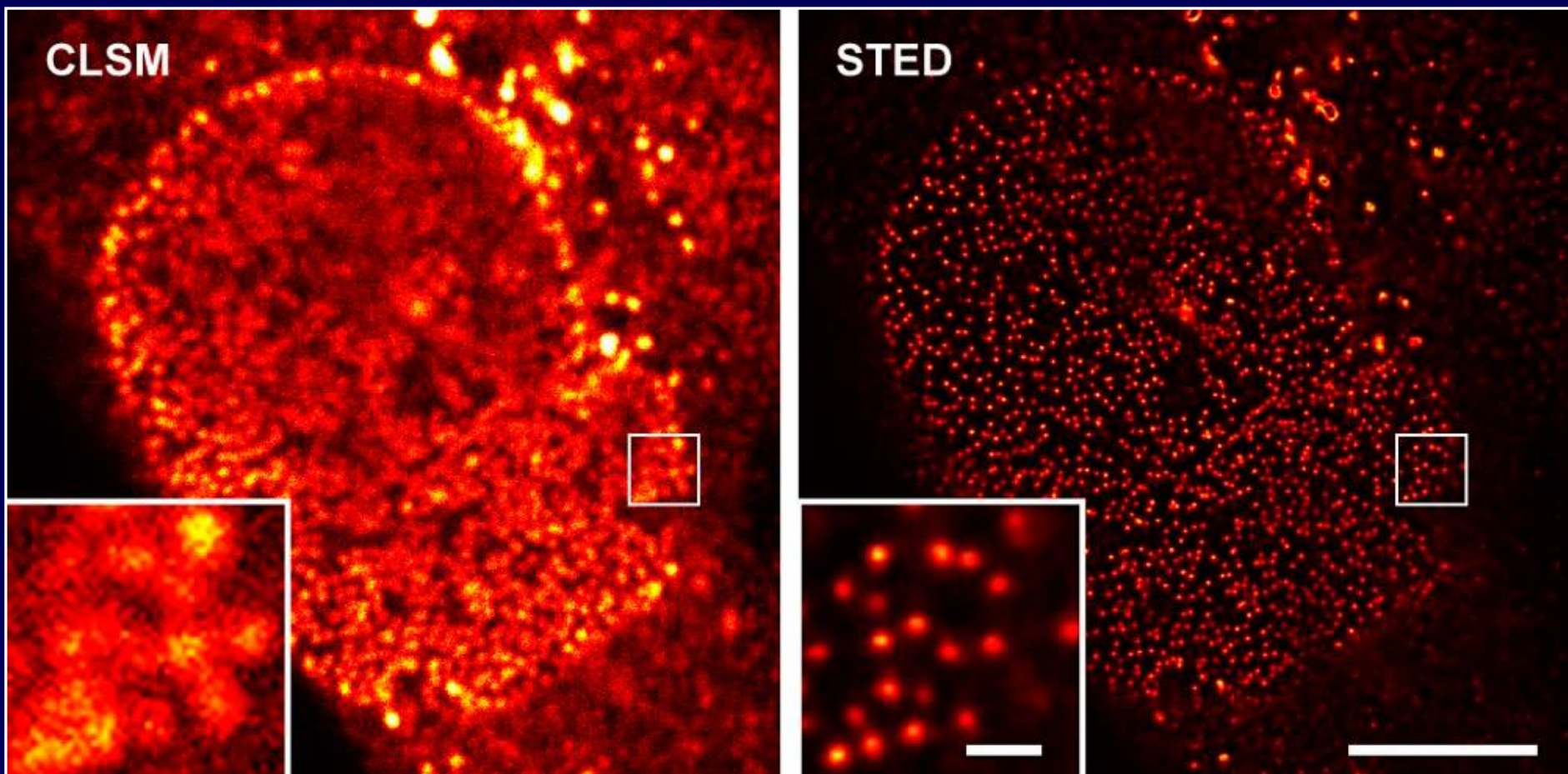
Fluorescenční záření tak vzniká pouze v nezhášené oblasti uvnitř mezikruží, čímž dochází ke zlepšení rozlišení.

Rozlišení závisí na tom, jak moc dokážeme omezit oblast, v níž nedochází k vyčerpávání fluorescence. Ta je limitována intenzitou záření laseru s delší vlnovou délkou a u biologických vzorků limituje nejlepší dosažitelné rozlišení, protože při přílišné intenzitě osvětlení dochází k poškození vzorku.

V praxi se **maximální rozlišení pohybuje kolem 50 nm, (v ose z 150 nm)**



Porovnání výsledků dosažených pomocí klasické konfokální mikroskopie (nahore) a pomocí mikroskopie STED (dole).



HeLa cell stained with primary antibodies against the **nuclear pore complex protein** Nup153 and secondary antibodies conjugated with ATTO647N. The image was acquired with a TCS STED confocal microscope (Leica). Bars: 5 μm (insets, 0.5 μm).

Schermelleh L., Heintzmann R. and Heinrich L. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. JCB 190, p. 165-175, 2010/6. Dostupné online: <http://jcb.rupress.org/content/190/2/165.full>

4Pi MIKROSKOPIE

- podobný klasickému konfokálnímu mikroskopu
- má **2 stejné objektivy**, každý na opačné straně vzorku, zaostřené na stejné místo

Obrazy z objektivů se skládají a ve výsledku tak fungují jako **jeden objektiv s dvojnásobkem numerické apertury**, což vede ke zlepšení rozlišení.

Díky **interferenci proti sobě jdoucích paprsků** se ještě více zmenšuje objem, do nějž se promítá bod, zejména v axiálním směru.

Výsledné **laterální (xy) rozlišení dosahuje až 100 nm a axiální (xz) rozlišení až 150 nm** (běžné axiální rozlišení 500-700 nm).

4Pi MIKROSKOPIE

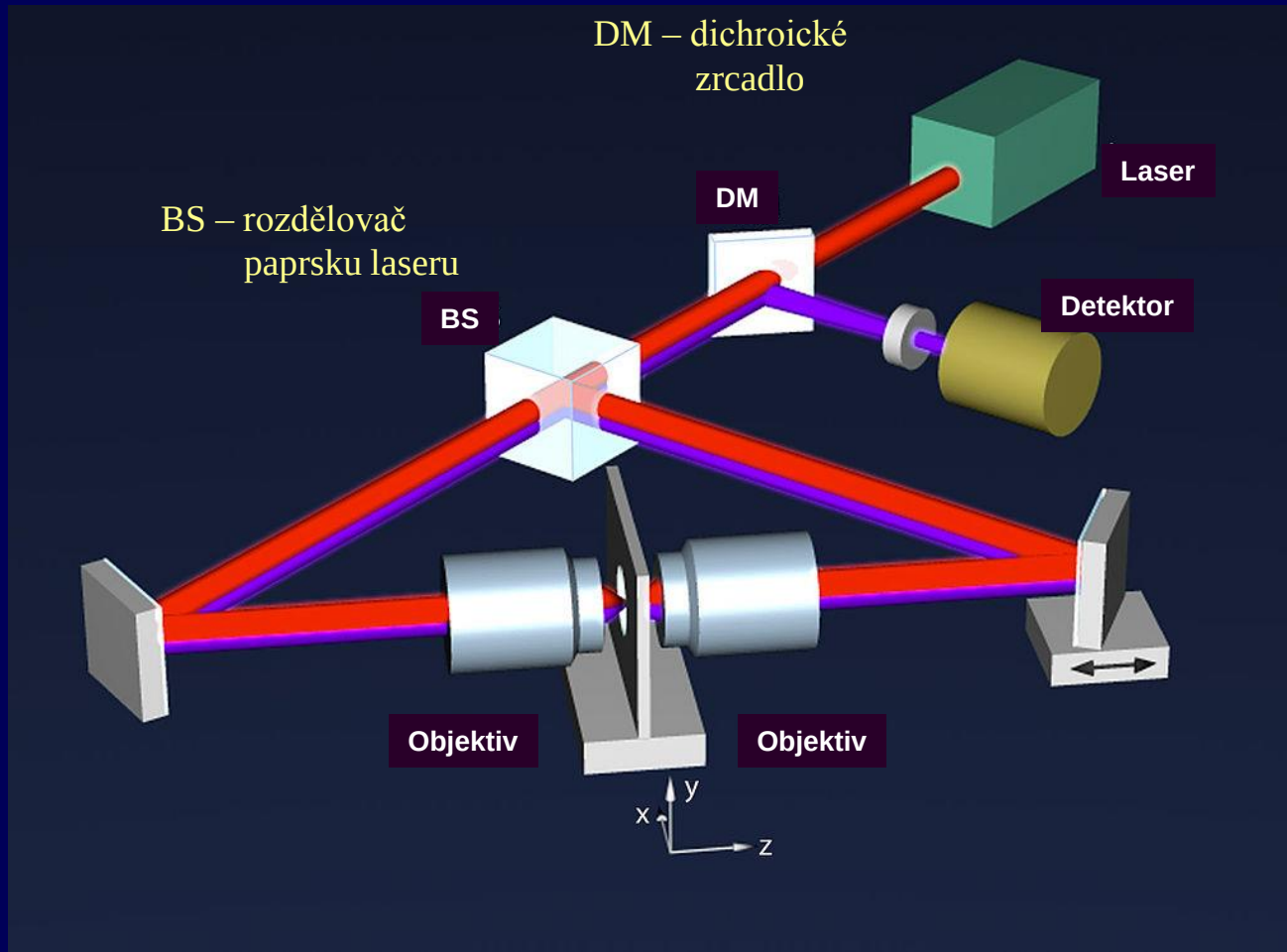
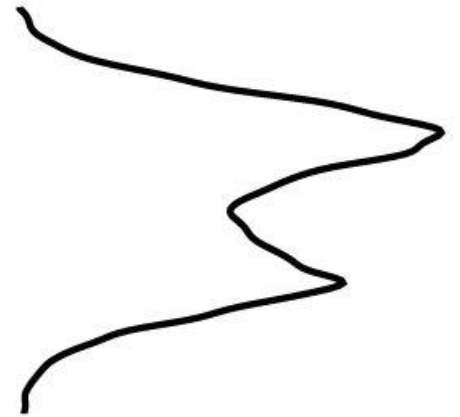
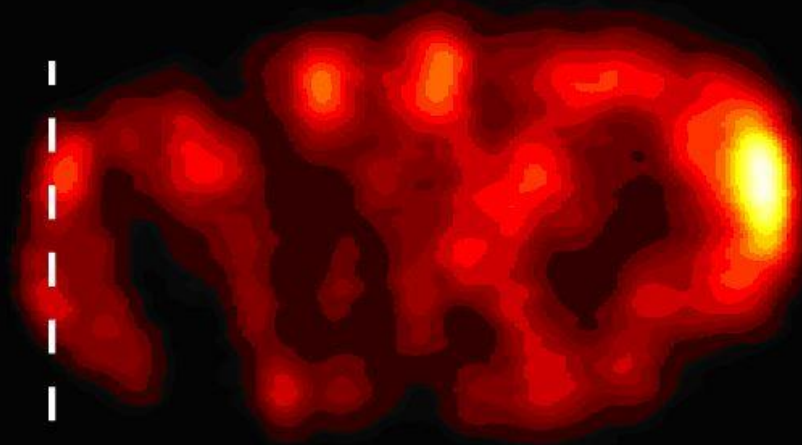
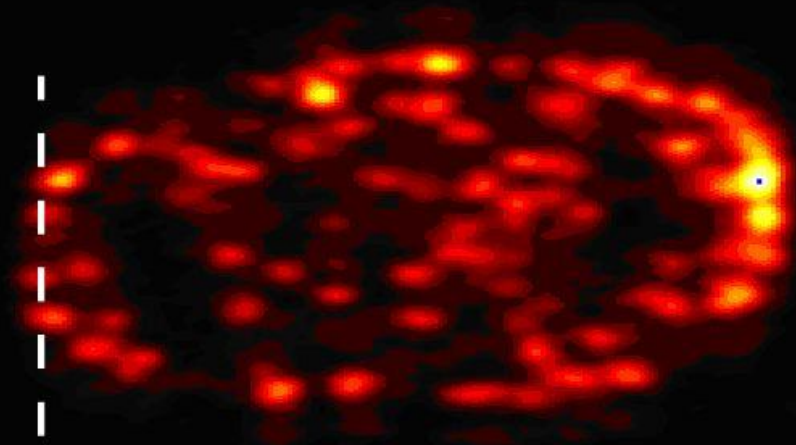


Schéma 4Pi mikroskopu

Confocal



4Pi raw



Microtubuli in a neuron cell

Cooperation with Max-Planck-Institut for bio-physical Chemistry, Department
NanoBiophotonik - Prof. Dr. S.W. Hell

https://www.dkfz.de/en/nanoscopy/Science/4pi_en.html

S I M

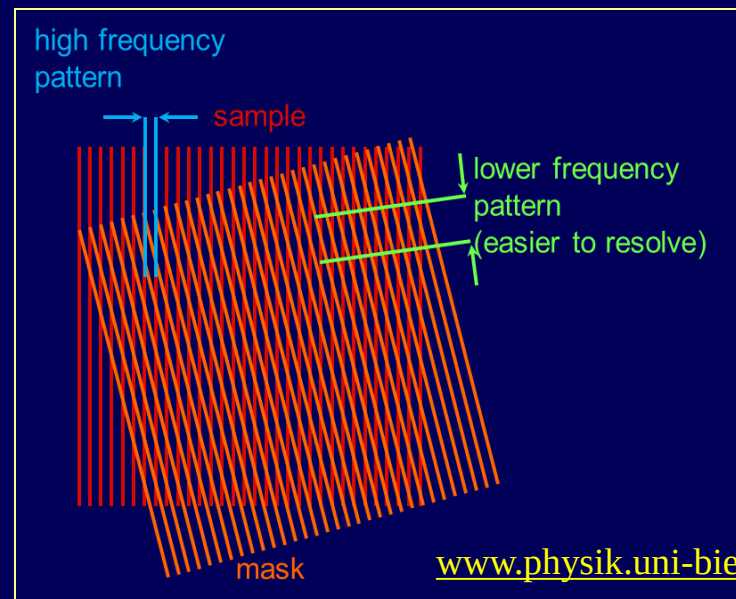
(Structured Illumination Microscopy)

- strukturované osvětlení

- využívá osvětlení vzorku **světlem s pruhovaným vzorem** vzniklým difrakcí na mřížce
- **interferencí** s detaily vzorku vzniká **moaré** efekt
- jeho následným **počítačovým zpracováním** lze spočítat, jak vypadaly struktury, jenž ho způsobily, a získat tak obrázek obsahující jemnější detaily **s rozlišením okolo 100 nm**

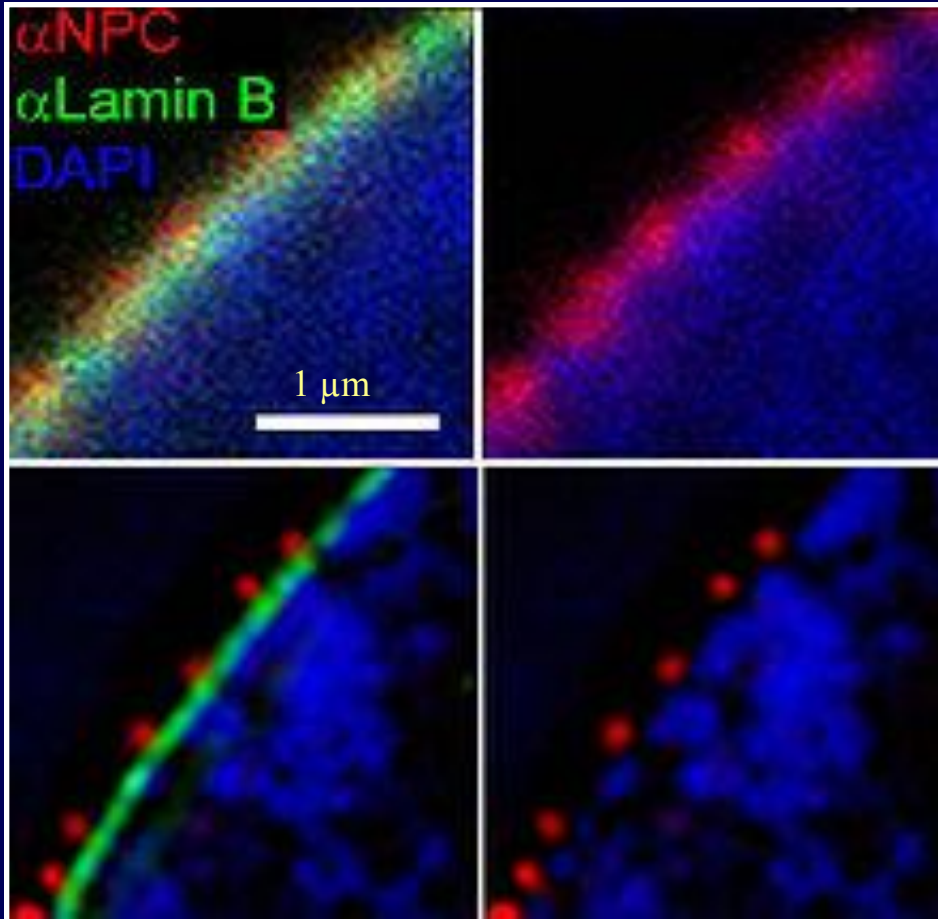


moaré efekt



S I M

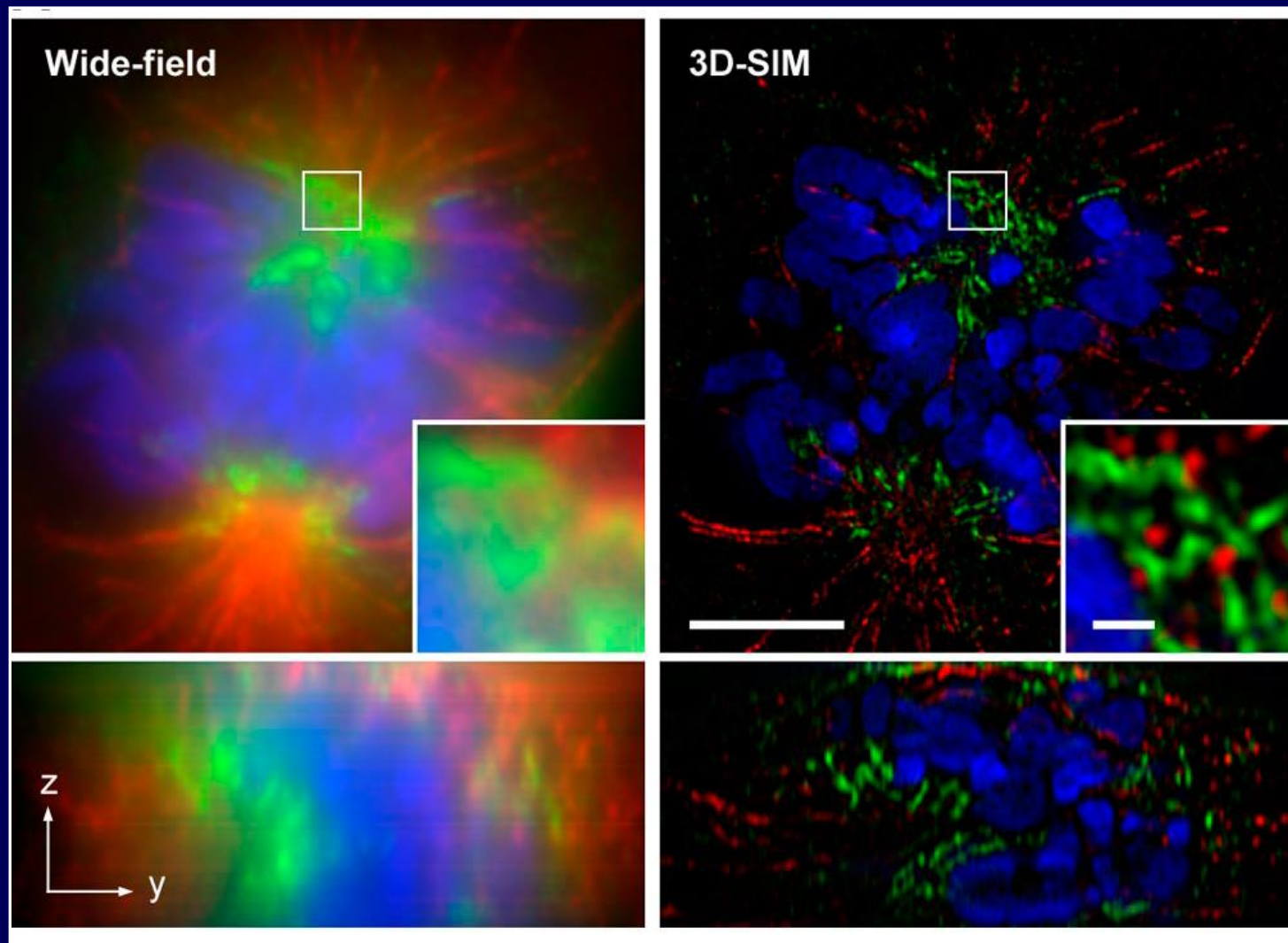
(Structured Illumination Microscopy)



Nahoře: CLSM

Dole: 3D-SIM

Detail jaderné membrány:
červeně jaderné póry (anti-NPC)
zeleně jaderný obal (anti-lamin)
modře chromatin (DAPI)



Conventional wide-field image (left) and 3D-SIM image of a **mouse C2C12 prometaphase cell** stained with primary antibodies against lamin B and tubulin, and secondary antibodies conjugated to Alexa 488 (green) and Alexa 594 (red), respectively. Nuclear chromatin was stained with DAPI (blue). 3D image stacks were acquired with a DeltaVision OMX prototype system (Applied Precision). The bottom panel shows the respective orthogonal cross sections. Bars: 5 µm (insets, 0.5 µm).

Schermelleh L., Heintzmann R. and Heinrich L. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. JCB 190, p. 165-175, 2010/6. Dostupné online: <http://jcb.rupress.org/content/190/2/165.full>

Metody superrozlišovací lokalizační mikroskopie

(Single-Molecule Localization Microscopy - SMLM)

Stochastická lokalizace

STORM (**ST**ochastic **O**ptical **R**econstruction **M**icroscopy)

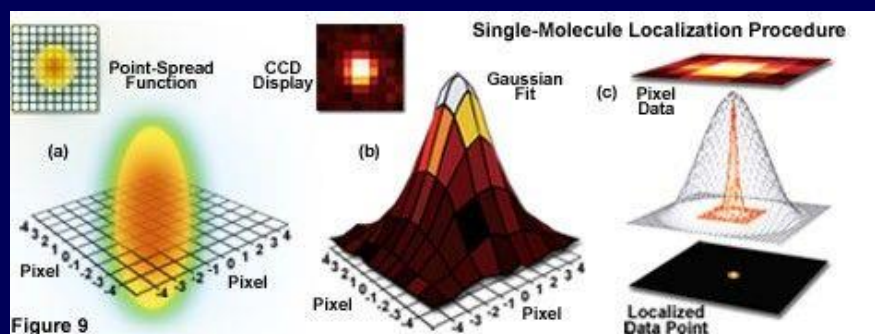
PALM (**P**hoto**A**ctivation **L**ocalization **M**icroscopy)

FPALM (**F**luorescence **P**hoto**A**ctivation **L**ocalization
Microscopy)

GSDIM (**G**roud **S**tate **D**epletion followed by **I**ndividual
Molecule return)

- Metody byly nezávisle publikovány krátce po sobě a využívají stejný princip.
- Fluorofory pro tyto metody mají **dva stavy - jeden schopný fluorescence a druhý fluorescence neschopný (fotoaktivace)**, které se dají přepínat světlem různých vlnových délek nebo se přepínají stochasticky (náhodile).
- **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 fluorofořů a snímají se, dokud se nevybělí. Tento postup se opakuje, dokud není nasnímáno dostatečné množství fluoroforů.

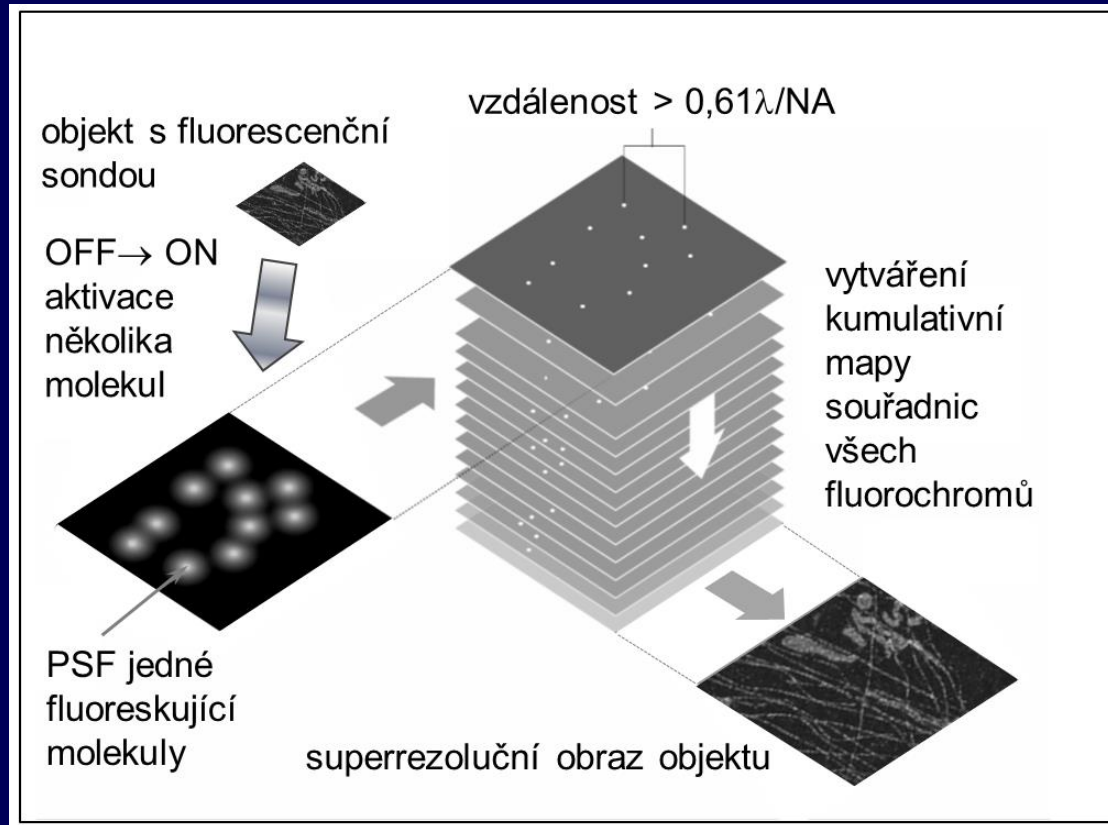
- Fotony nasnímané z jednoho fluoroforu jsou detekovány na širším prostoru podle **rozptylové funkce (PSF, point spread function)**. Poté se matematicky určí střed PSF a danému fluoroforu se přiřadí tato spočítaná souřadnice. Čím více fotonů se detekuje z daného fluoroforu, tím lépe je definovaná PSF a tím přesnější je lokalizace fluoroforu. Lze dosáhnout **rozlišení až v jednotkách nm**.



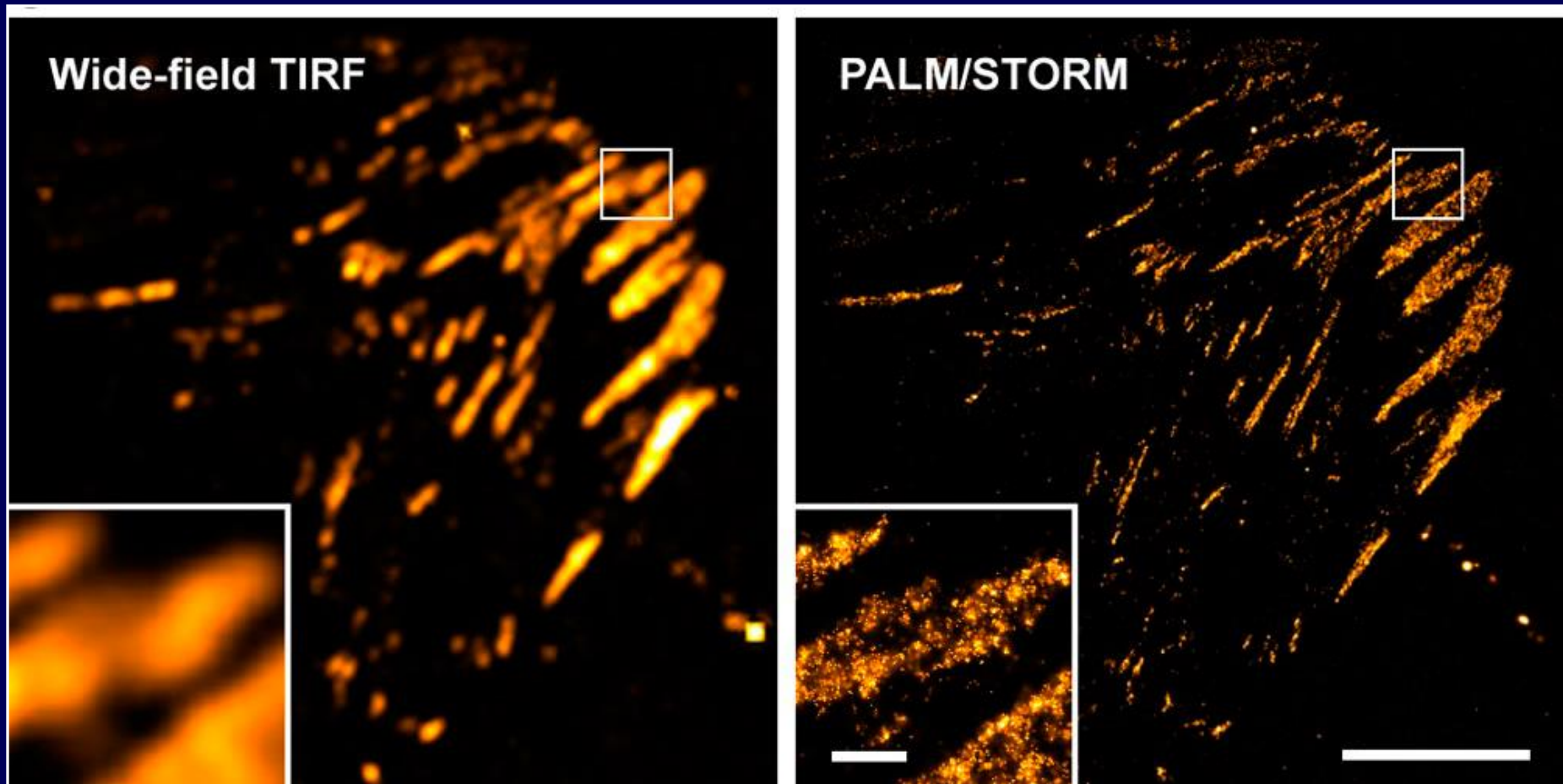
- Jako fluorofory se využívají buď **fotoaktivovatelné fluorescenční proteiny** (např. PA-GFP), nebo **fluorescenční barviva** (např. Cy3, Cy5, Alexa).
- K aktivaci fluoroforu obvykle dochází osvětlením laserem s nízkou intenzitou, využívající jinou barvu, než se poté využívá k vybuzení fluorescence.

Nevýhoda: obvykle **delší doba snímání** celkového obrazu, protože se musí nasnímat velké množství dílčích obrazů

Princip lokalizační superrezoluční mikroskopie



V objektu obsahujícím fotoaktivovatelnou nebo fotoregulovatelnou fluorescenční sondu je malý počet náhodile (stochasticky) vybraných a dostatečně navzájem vzdálených fluorochromů přepnut aktivačním světelným pulzem do fluorescenčního stavu. Z jejich centroidních souřadnic je pak po několika desítkách tisíc opakování takové lokalizace vytvořen superrezoluční obraz distribuce fluorescenční sondy ve studovaném objektu.

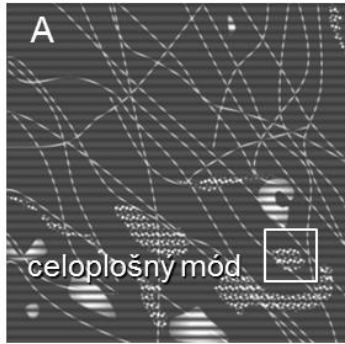


TdEosFP-paxillin expressed in a **Hep G2 cell** to label adhesion complexes at the lower surface. The image was acquired on an ELYRA P.1 prototype system (Carl Zeiss, Inc.) using TIRF illumination. Single molecule positional information was projected from 10,000 frames recorded at 30 frames per second. On the left, signals were summed up to generate a TIRF image with conventional wide-field lateral resolution. Bars: 5 μm (insets, 0.5 μm).

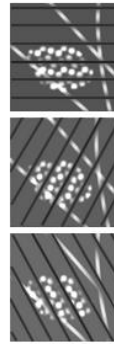
Schermelleh L., Heintzmann R. and Heinrich L. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. JCB 190, p. 165-175, 2010/6. Dostupné online: <http://jcb.rupress.org/content/190/2/165.full>

Porovnání tří hlavních strategií superrezoluční mikroskopie

Extrapolace OTF
SIM, NSIM

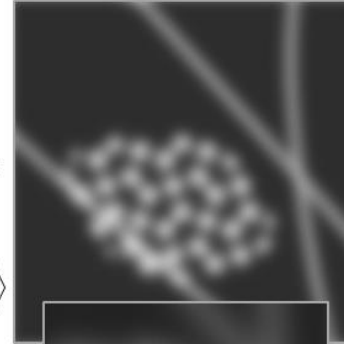


tři orientace periodického
rastru (krok 60°)



prolínání
periodického
osvětlení se
strukturními
detaily objektu
efekt moaré

matematická
rekonstrukce

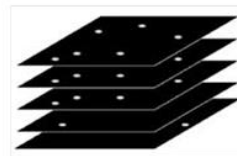
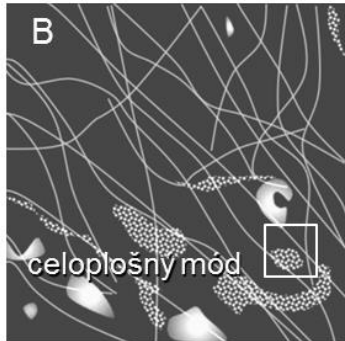


SIM

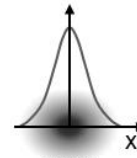
Rozlišení
cca 100 nm

Standardní
celoplošná
optická
mikroskopie

Stochastická lokalizace
PALM, FPALM, STORM

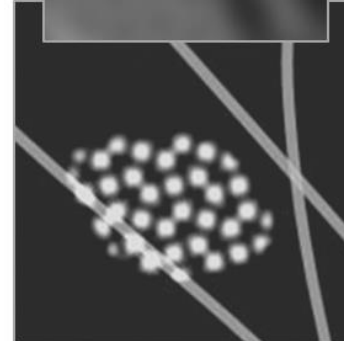


pointillismus



PSF
lokalizace

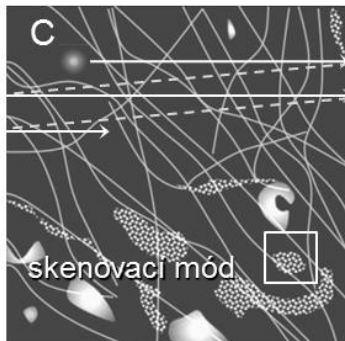
statisčové série snímků
jednotlivých fluorochromů



**PALM
FPALM
STORM**

Rozlišení až
jednotky nm

Lokální redukce PSF
STED

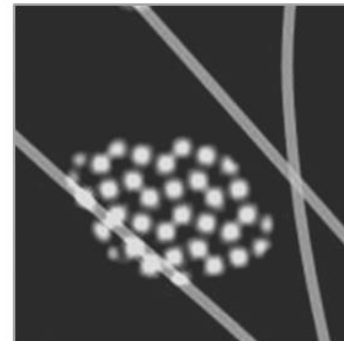
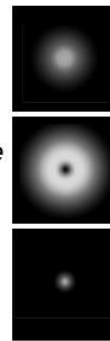


excitační PSF

STED paprsek

redukce fluorescence
stimulovanou emisí

redukováná PSF
spontánní
fluorescence



STED

Rozlišení
cca 50 nm

Legenda k předchozímu obrázku:

Ve třech obrázcích levého sloupce je schematicky znázorněna vnitřní struktura hypotetické buňky s mikrotubulárními vlákny a granulárními útvary. Vložené bílé rámečky lokalizují polohu oblasti zobrazené ve zvětšené podobě v pravém sloupci. Vzhled zvětšených obrázků zjednodušeně naznačuje rozdílné možnosti jednotlivých metod. Zatímco **obyčejná SIM metoda** nabízí pouze dvojnásobné zlepšení rozlišovací schopnosti, které znamená výrazné zlepšení oproti standardní celoplošné mikroskopii (viz vložený segment), ale není ještě dostatečné pro realistické zobrazení rozměrů jemných buněčných struktur, **metody stochastické lokalizace (PALM, FPALM, STORM) a metoda redukce fluorescence stimulovanou emisí (STED)** umožňují nanoskopické zobrazení mikrotubulů a dalších struktur blízkých k 20 nm.

STED je z hlediska zkoumání dynamických jevů v živých buňkách perspektivnější než metody lokalizační.

LITERATURA K SUPERROZLIŠOVACÍ MIKROSKOPII

- **Plášek, Jaromír (2015):** Superrozlišení v optické mikroskopii - Nobelova cena za chemii za rok 2014. Pokroky matematiky, fyziky a astronomie 60, p. 23-28. Dostupné online: http://www.cs.cas.cz/hanka/pmfa/1_15/plasek.pdf
- **Rous, Zdeněk (2015):** Cesta optické mikroskopie k superrozlišení - Nobelova cena za chemii 2014. Vesmír 94, p. 168, 2015/3. Dostupné online: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/cesta-opticke-mikroskopie-k-superrozliseni>
- **Schermelleh L., Heintzmann R. and Heinrich L. (2010):** A guide to super-resolution fluorescence microscopy. JCB 190, p. 165-175. Dostupné online: <http://jcb.rupress.org/content/190/2/165.full>
- **Valenta, Jan (1995):** Spektroskopie jednotlivých molekul v blízkém optickém poli. Vesmír 74, p. 126. Dostupné online: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/spektroskopie-jednotlivych-molekul-v-blizkem-optickem-poli>
- **Vrtiška, Ondřej (2014):** Nobelova cena za překonání limitů optického mikroskopu, 2014/10. Dostupné online: <http://vesmir.cz/2014/10/08/nobelova-cena-prekonani-limitu-optickeho-mikroskopu/>
- <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/super-resolution-gsd-microscopy>
- **Jaroslav Zelenka:** Superrezoluční mikroskopie (nanoskopie) - prezentace <http://clab.vscht.cz/files/uzel/0027688/Cy4tSC0qSq0CAA.pdf?redirected>