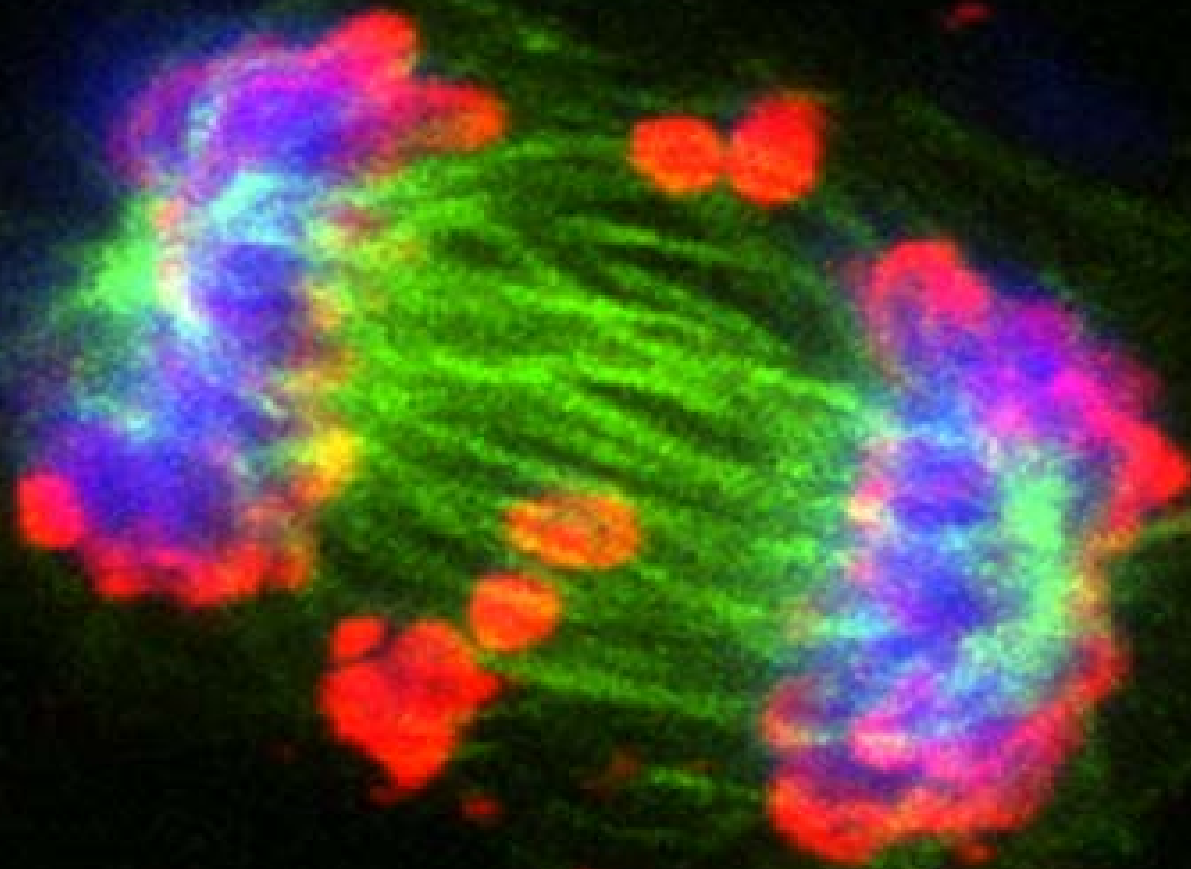
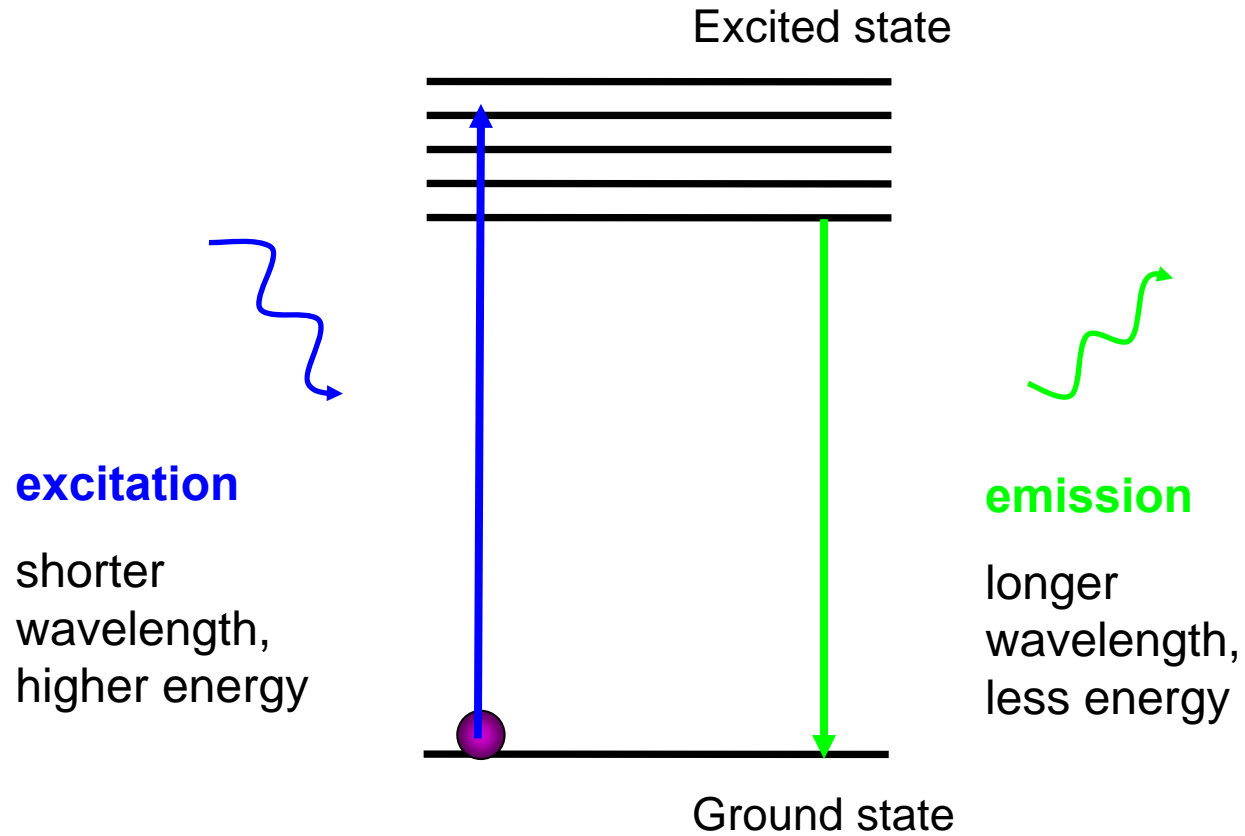


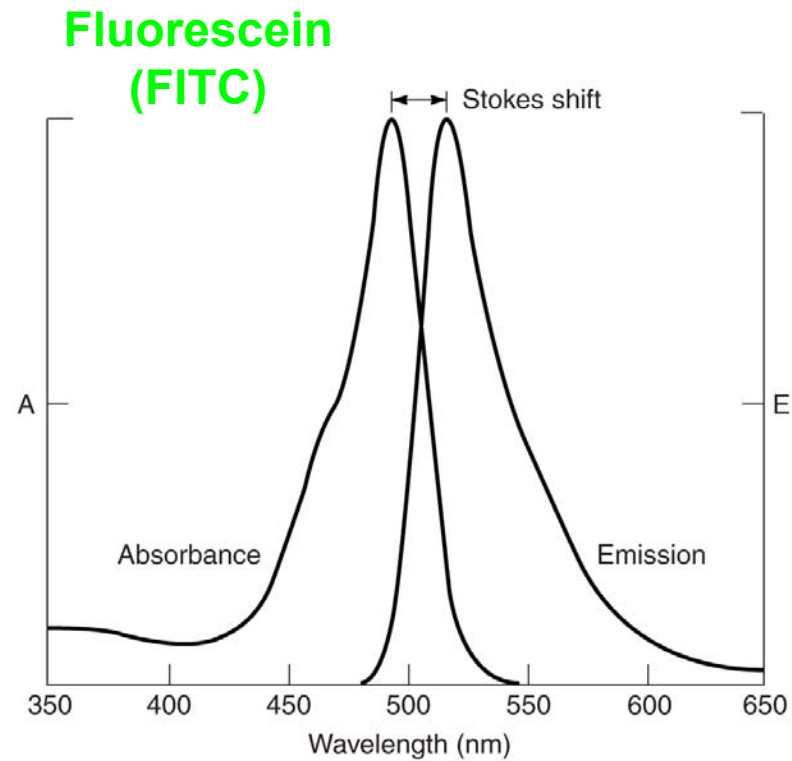
Μικροσκοπία Φθορισμού - Μέρος 2^ο



Φθορισμός



Φάσματα απορρόφησης και εκπομπής φθορίζόντων μορίων



Τεχνικές Μικροσκοπίας Φθορισμού

- **Κλασσικές τεχνικές**

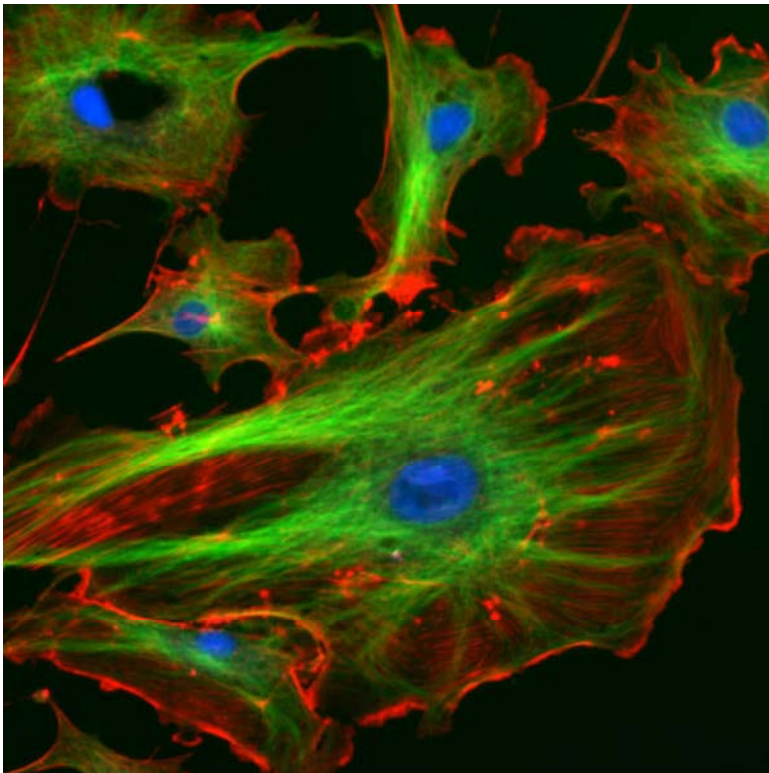
- » Wide-field fluorescence microscopy (μικροσκοπία φθορισμού ευρέως πεδίου)

- » **Confocal laser scanning microscopy, CLSM**
(Συνεστιακή Μικροσκοπία)

- » 2-photon

Μικροσκοπία φθορισμού ευρέως πεδίου (wide-field)

Επιθηλιακό κύτταρο

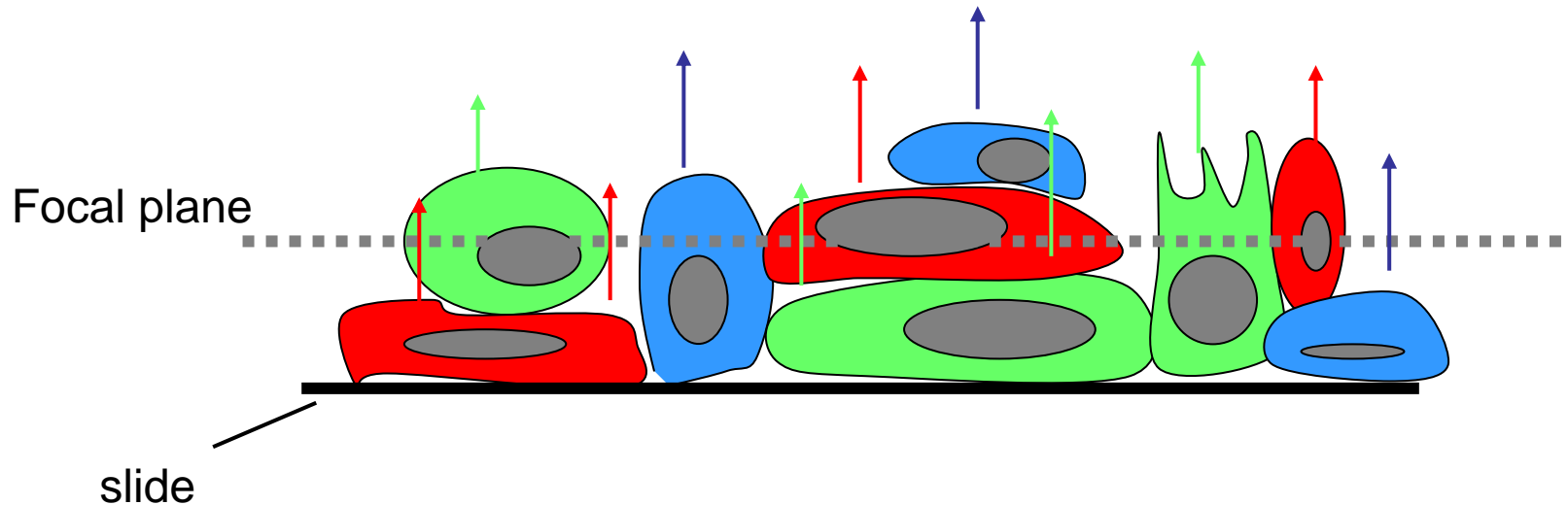


Green: tubulin Red: phalloidin

Blue: DAPI

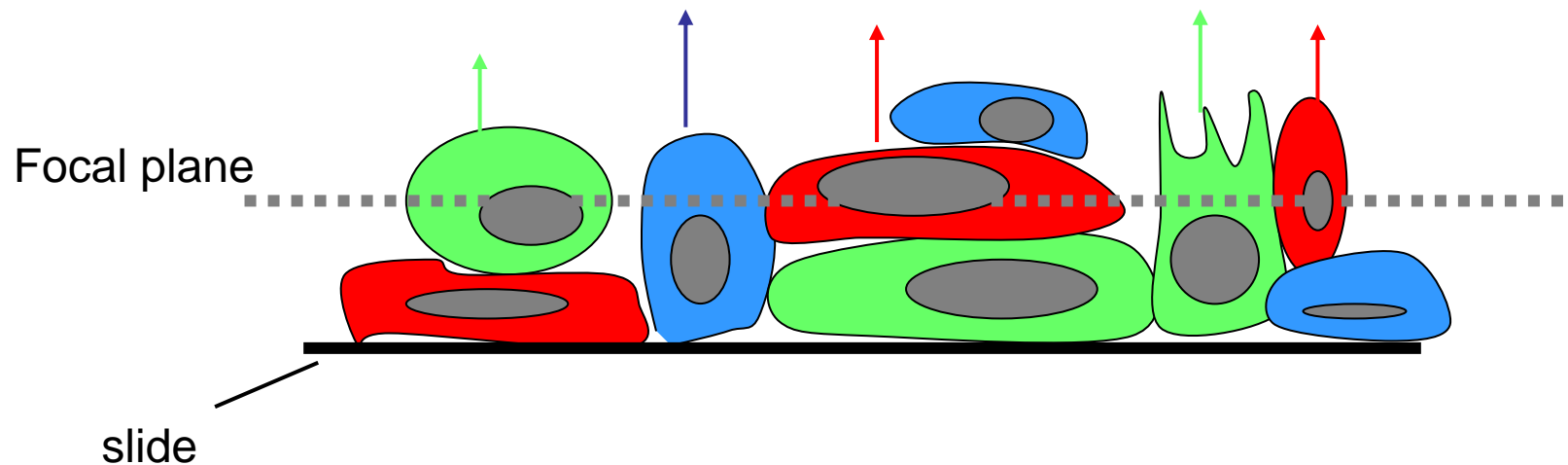
- Εντοπισμός μακρομορίων
- Μορφολογία κυττάρων
- Κυτταρικές λειτουργίες (κυτταρική διαίρεση, απόπτωση, κ.ά.)

Φθορίζοντα παρασκευάσματα με σημαντικό πάχος όπως στρογγυλά κύτταρα ή τομές ιστών δεν απεικονίζονται καλά με μικροσκοπία φθορισμού ευρέως πεδίου διότι φθορίζοντα σήματα από μόρια που ευρίσκονται εκτός αλλά κοντά στο επίπεδο εστίασης ανιχνεύονται, αυξάνουν το background και δίνουν εικόνες με χαμηλή αντίθεση (contrast)

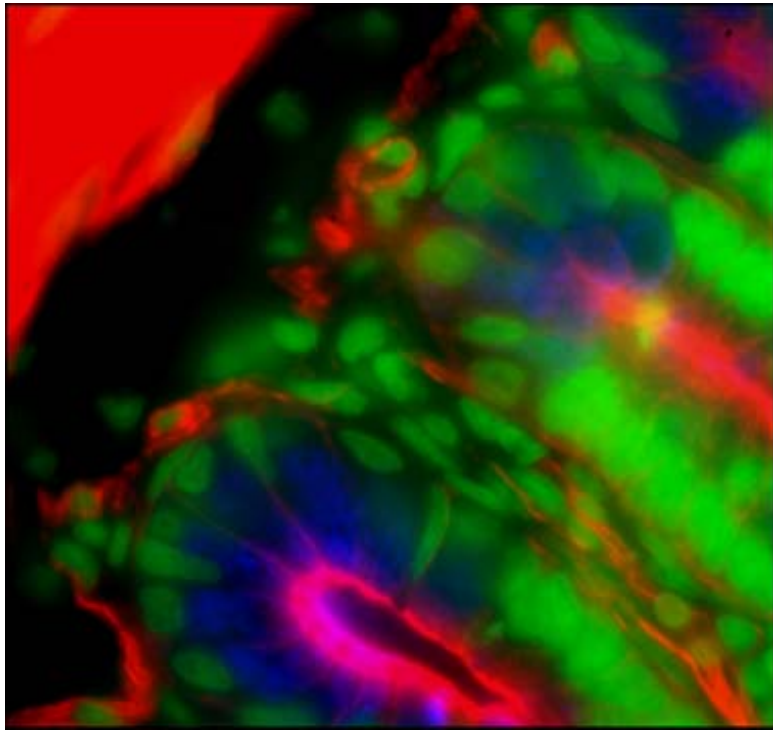


Η συνεστιακή μικροσκοπία (confocal laser scanning microscopy) επιλύει το πρόβλημα διότι απορρίπτει σήματα από κοντινά αντικείμενα πάνω ή κάτω από το επίπεδο εστίασης

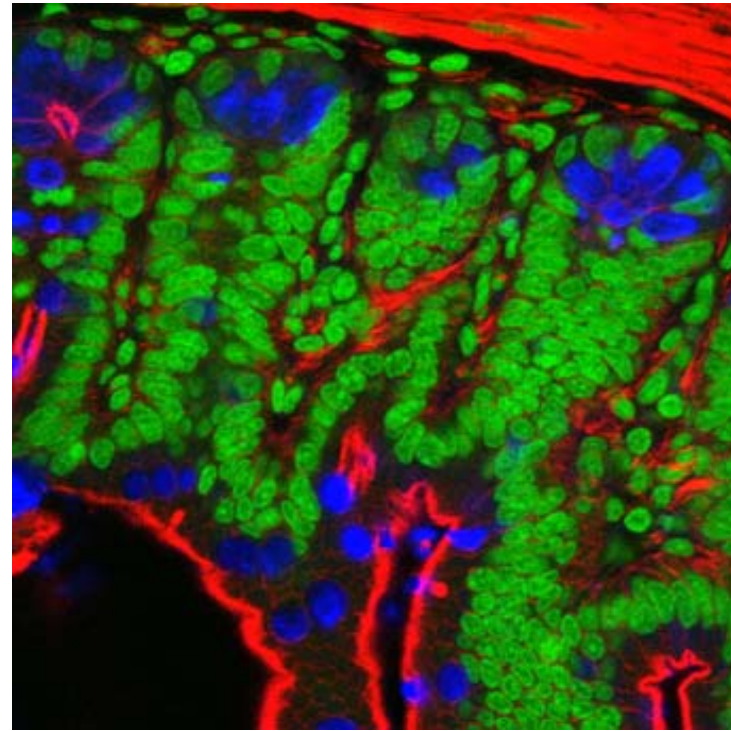
Με τη συνεστιακή μικροσκοπία παρατηρούμε οπτικές «τομές» του παρασκευάσματος!!



Wide-field vs confocal



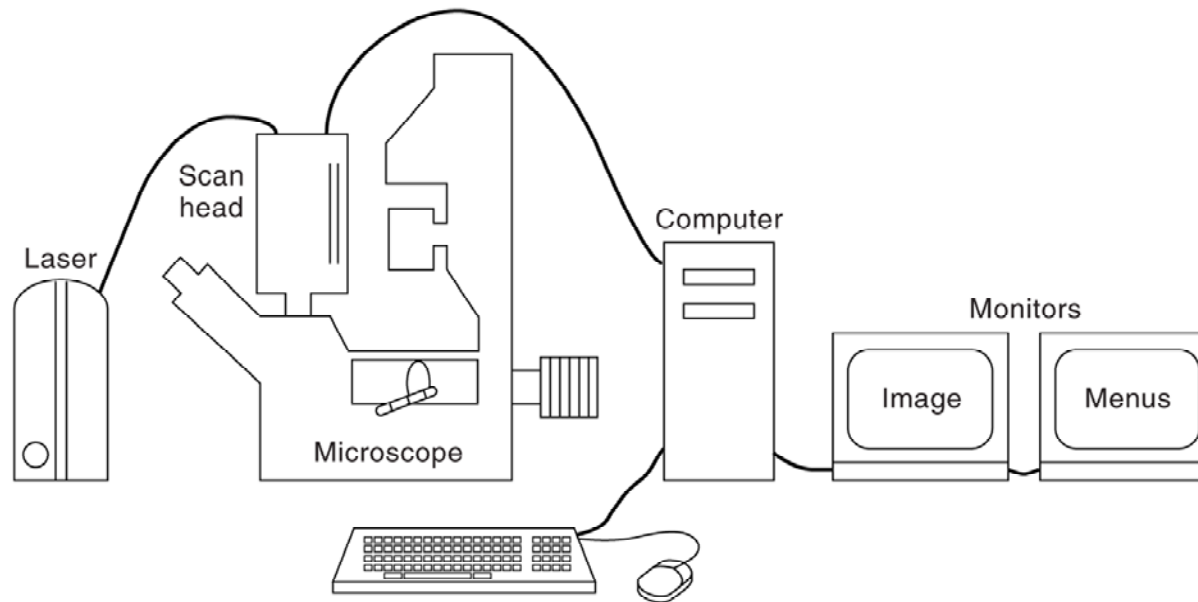
Wide-field image



Confocal image

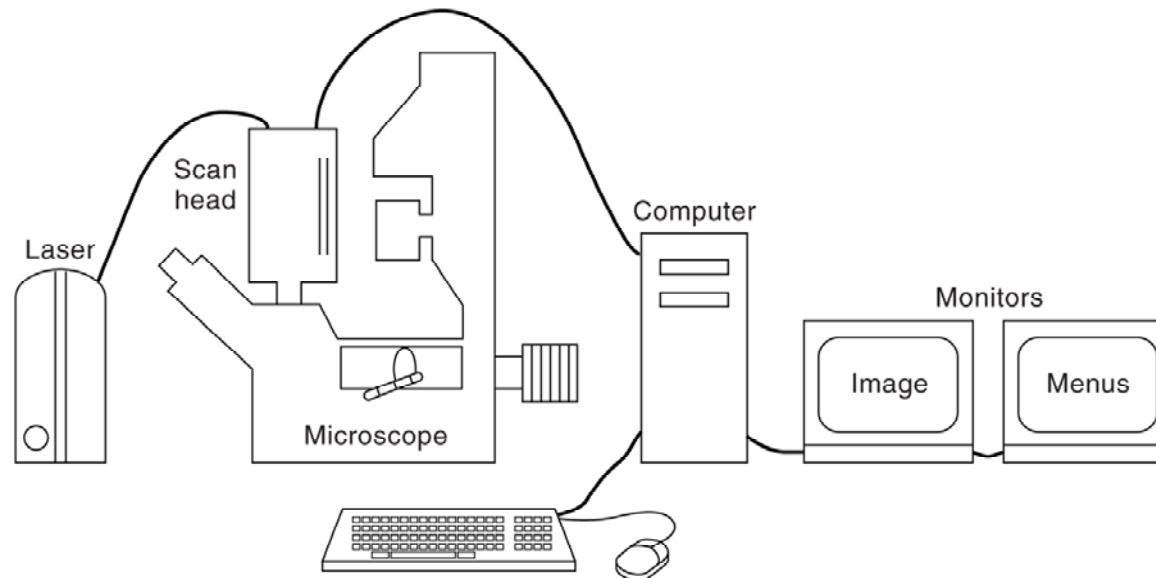
Mouse Intestine

Βασικά στοιχεία του συνεστιακού μικροσκοπίου



Αποτελείται από μικροσκόπιο φθορισμού, πολλαπλές πηγές φωτός laser, την κεφαλή σάρωσης (scan head) με οπτικά και ηλεκτρονικά στοιχεία, ηλεκτρονικό υπολογιστή, software και οθόνες για συλλογή, επεξεργασία και ανάλυση της εικόνας

Βασικά στοιχεία του συνεστιακού μικροσκοπίου

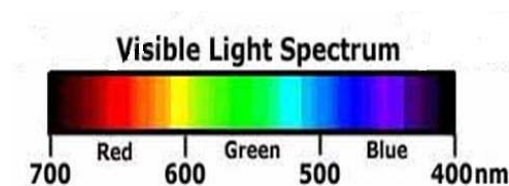


Το laser παρέχει τη φωτεινή δέσμη η οποία υπό τον έλεγχο ηλεκτρονικού υπολογιστή «σαρώνει» το παρασκεύασμα. Η κεφαλή σάρωσης του confocal κατευθύνει τα φθορίζοντα σήματα από το παρασκεύασμα στην pinhole και τον φωτοπολλαπλασιαστή (photomultiplier, PMT). Ο ηλεκτρονικός υπολογιστής μετατρέπει τις διαφορές έντασης φωτός σε ψηφιακή εικόνα.

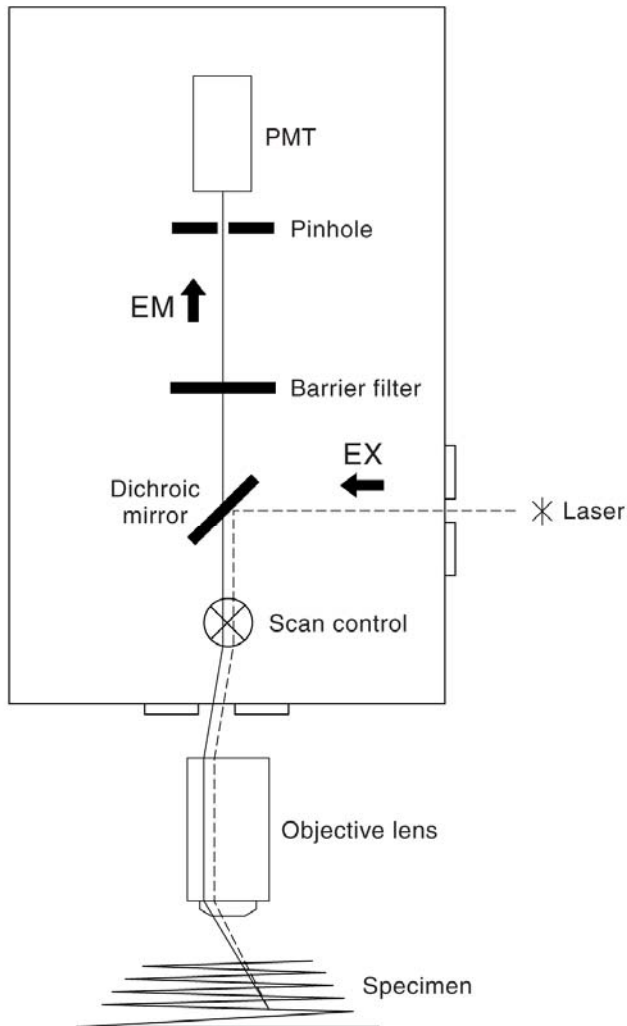
Η εικόνα του confocal δεν δημιουργείται στο μικροσκόπιο και μπορούμε να τη δούμε μόνο στην οθόνη του ηλεκτρονικού υπολογιστή.

Lasers που χρησιμοποιούνται συχνά στη συνεστιακή μικροσκοπία

Laser type	Wavelength (nm)			
	UV	Blue	Green	Red
Argon	364	488	514	
Helium/Cadmium		442		
Krypton/Argon			568	
Red Helium/ Neon				633

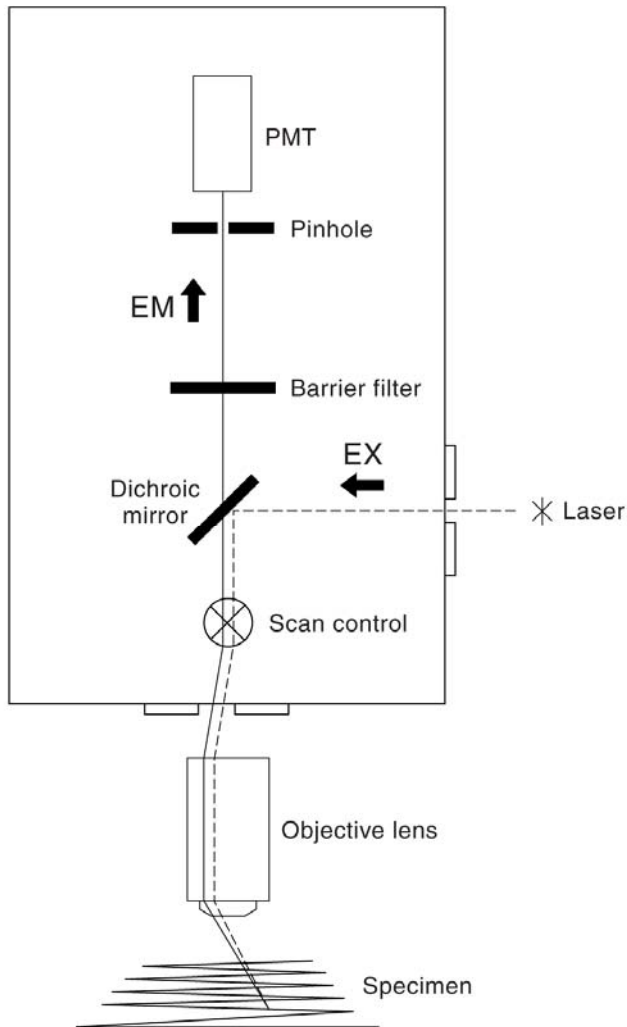


Η οπτική διάταξη του confocal scan head (I)



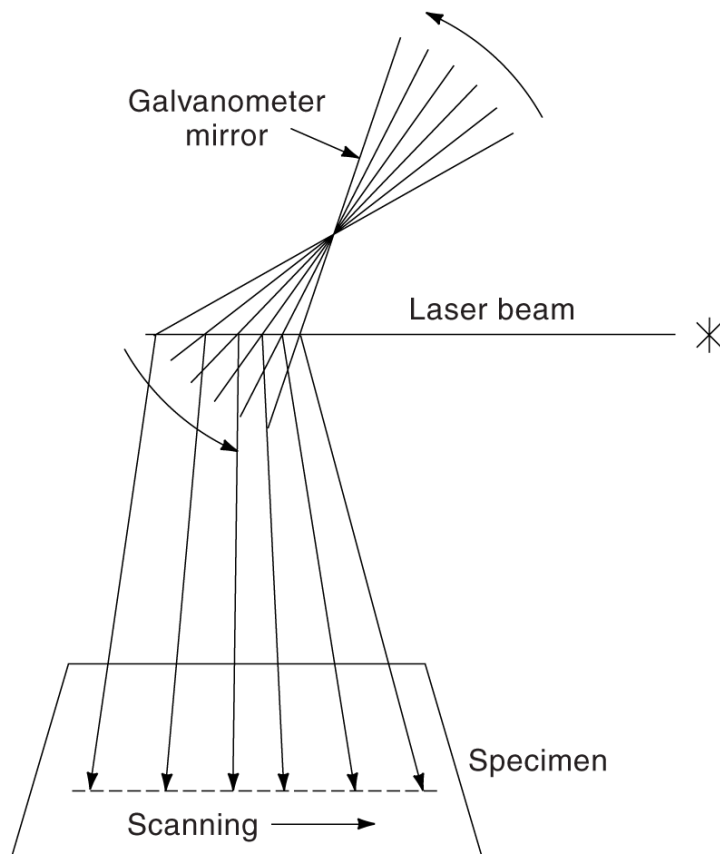
- Διάταξη εισαγωγής φωτός laser
- Φίλτρα φθορισμού
- Μηχανισμός σάρωσης (scanning) του παρασκευάσματος
- Διάφραγμα Pinhole
- Φωτοπολλαπλασιαστής (PMT)

Η οπτική διάταξη του confocal scan head (II)



- Epi-illumination
- Η δέσμη laser επικεντρώνεται σε ένα σημείο του παρασκευάσματος και σαρώνει το επίπεδο εστίασης από δεξιά προς τα αριστερά και από επάνω προς τα κάτω
- Η pinhole ευρίσκεται στο επίπεδο σχηματισμού του ειδώλου. Δέχεται τα φωτόνια φθορισμού από το σημείο του παρασκευάσματος το οποίο σαρώνει η δέσμη laser και αποκλείει το φθορισμό από σημεία εκτός του επιπέδου εστίασης
- Ο PMT δέχεται συνεχή ροή φωτονίων η οποία μετατρέπεται σε αλλαγές ηλεκτρικής τάσεως
- Ο ηλεκτρονικός υπολογιστής μετατρέπει τις αλλαγές τάσεως σε ψηφιακό φωτεινό σήμα στην οθόνη

Ο μηχανισμός ελέγχου σάρωσης του CLSM

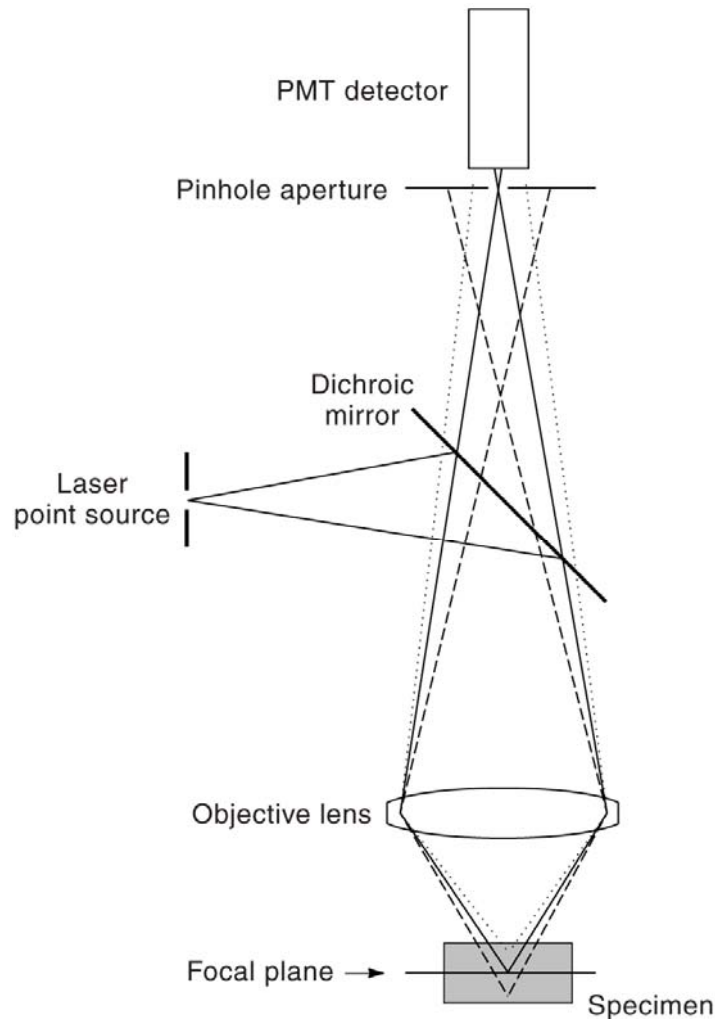


- Ο μηχανισμός περιλαμβάνει δύο καθρέπτες στο εσωτερικό του confocal scan head (στο σχήμα φαίνεται ο ένας) οι οποίοι ταλαντώνονται σε διευθύνσεις κάθετες μεταξύ τους

- Ο ένας καθρέπτης ελέγχει τη σάρωση του παρασκευάσματος κατά τον άξονα x και ο άλλος κατά τον άξονα y

- Η ταχύτητα σάρωσης και η έκταση της περιοχής που σαρώνεται ελέγχονται από τον χρήστη

Η λειτουργία της pinhole

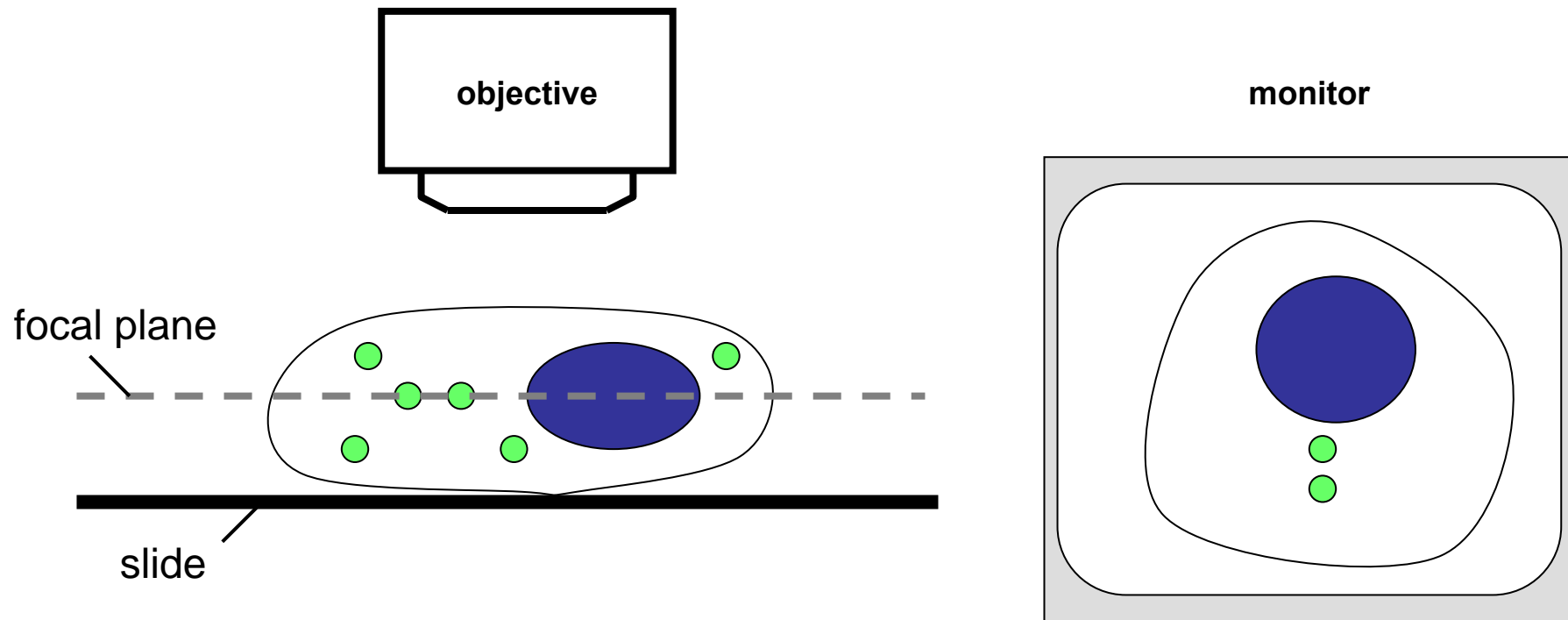


- Φθορίζουσα ακτινοβολία η οποία εκπέμπεται από σημείο του παρασκευάσματος στο επίπεδο εστίασης (σάρωσης), σχηματίζει στο διάφραγμα της pinhole μικρό φωτεινό σημείο

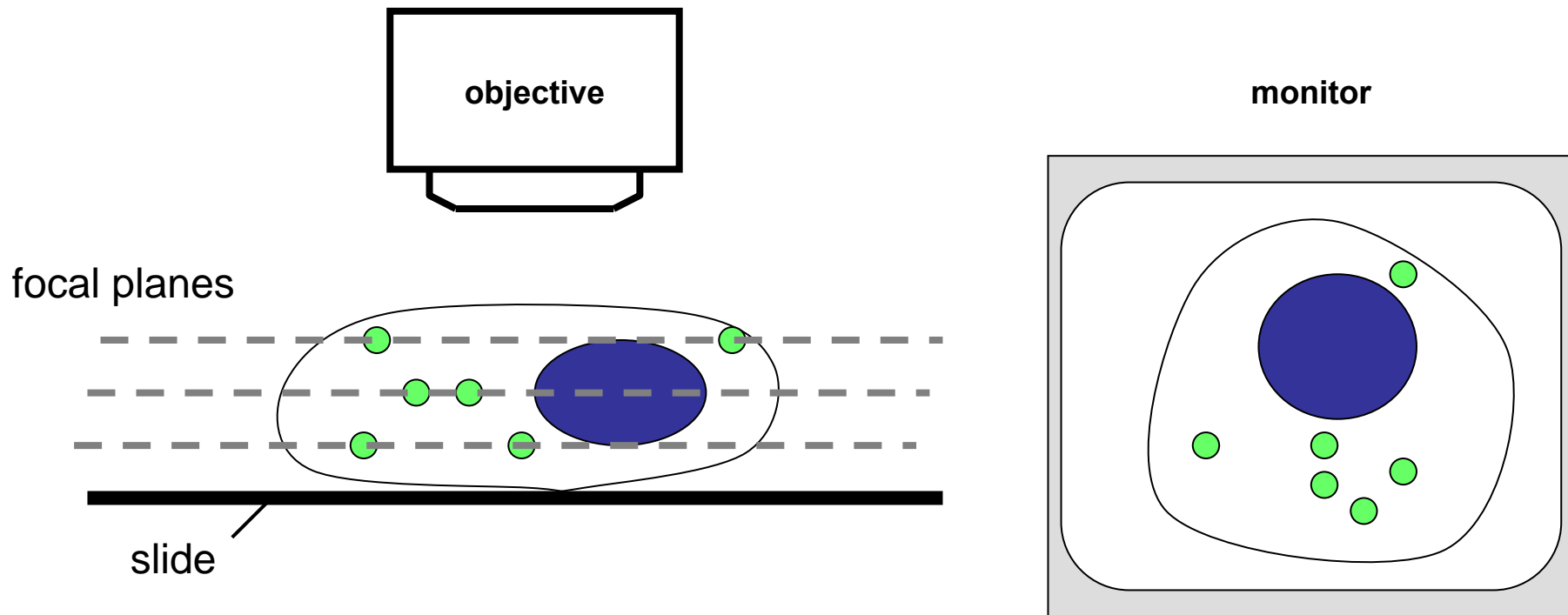
- Φθορίζουσα ακτινοβολία η οποία εκπέμπεται από σημεία του παρασκευάσματος πάνω ή κάτω από το επίπεδο εστίασης (σάρωσης) σχηματίζει στο διάφραγμα της pinhole φωτεινό δίσκο

- Μόνο ελάχιστο ποσοστό ακτινοβολίας από θέσεις εκτός επιπέδου εστίασης συλλέγεται από τον ανιχνευτή PMT, έτσι επιτυγχάνεται καλύτερη παρατήρηση λεπτομερειών του παρασκευάσματος από ό,τι με μικροσκοπία φθορισμού ευρέως πεδίου)

Παρατήρηση με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας



Τρισδιάστατη παρατήρηση με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας



- Διαδοχική σάρωση του παρασκευάσματος σε πολλαπλά επίπεδα (οπτικές τομές) με προκαθορισμένη απόσταση (step) μεταξύ τους κατά τον άξονα z
- Deconvolution software: Προβολή των οπτικών τομών σε ένα επίπεδο ή τρισδιάστατη αναπαράσταση

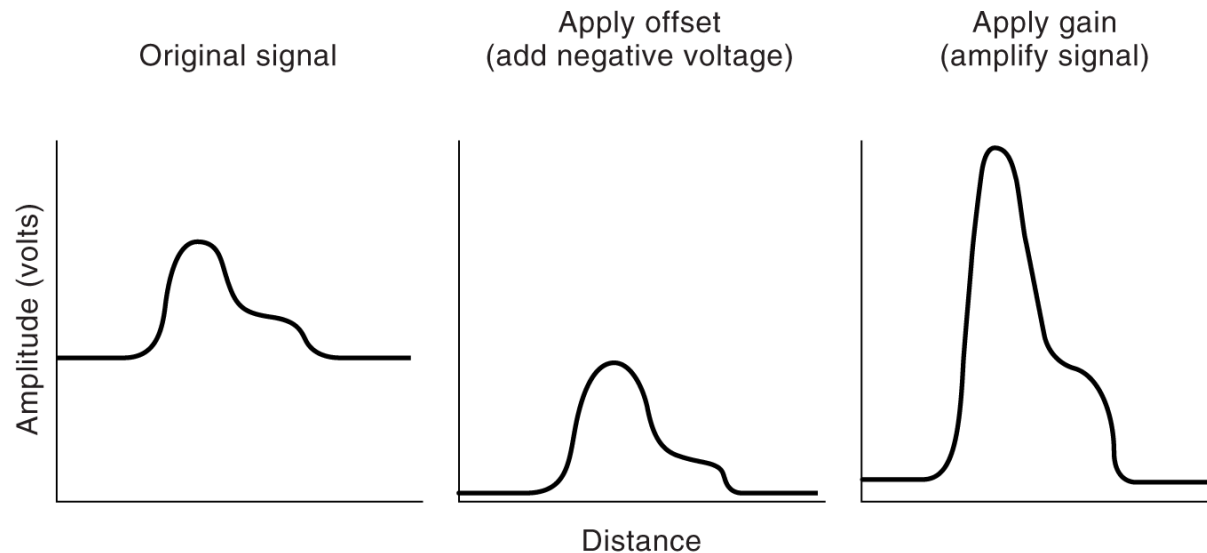
Κριτήρια για την ποιότητα της εικόνας συστήματος συνεστιακής μικροσκοπίας

- Διακριτικό όριο
- Ένταση φωτεινού σήματος
- Λόγος σήματος προς θόρυβο

Ρύθμιση της ποιότητας της εικόνας κατά τη συνεστιακή μικροσκοπία

- Αριθμητικό άνοιγμα, μεγέθυνση και διόρθωση σφαλμάτων από τον αντικειμενικό φακό
- Ρυθμίσεις offset και gain του PMT
- Ρυθμίσεις pinhole
- Ταχύτητα σάρωσης
- Zoom εικόνας

Ρυθμίσεις offset και gain από τον αναλυτή PMT

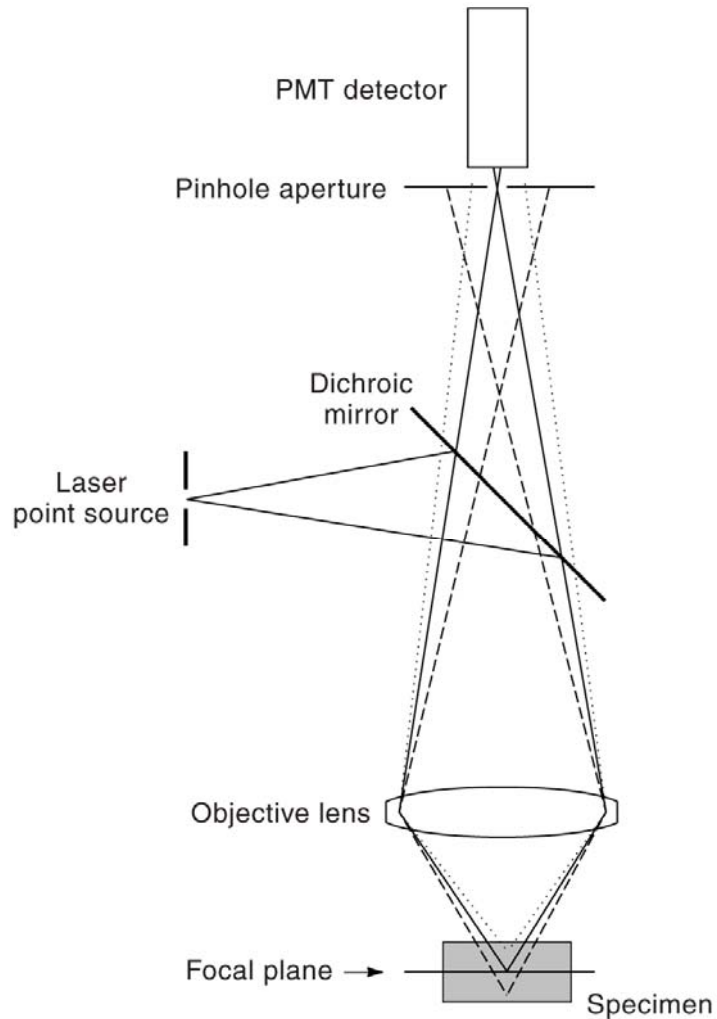


Οι ρυθμίσεις gain και offset (αντιστάθμιση) γίνονται ηλεκτρονικά από τον χρήστη και βελτιώνουν το λόγο: σήμα/ θόρυβος

Το offset καθορίζει το κατώφλι ανίχνευσης φωτός από τον PMT

Το gain αυξάνει το σήμα πολλαπλασιάζοντας την τάση που βγαίνει από τον PMT επί ένα σταθερό συντελεστή πριν αυτή μετατραπεί σε ψηφιακό σήμα. Το gain ρυθμίζεται μετά από το offset

Ρύθμιση της pinhole



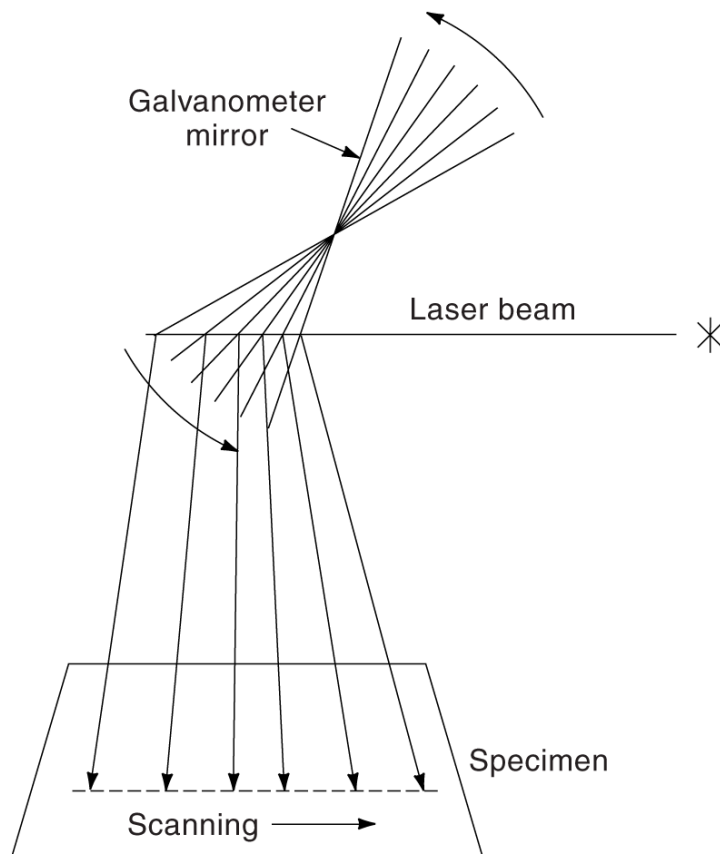
Μεγαλύτερη pinhole = παρατήρηση πιο παχιάς «τομής» του παρασκευάσματος

Μεγαλύτερη pinhole = μεγαλύτερη ένταση σήματος φθορισμού

- **Μεγαλύτερη pinhole = μικρότερη διακριτική ικανότητα λόγω πρόσληψης φθορίζουσας ακτινοβολίας από σημεία εκτός του επιπέδου εστίασης**

- **Η ρύθμιση του μεγέθους της pinhole γίνεται ηλεκτρονικά**

Ρύθμιση της ταχύτητας σάρωσης του παρασκευάσματος

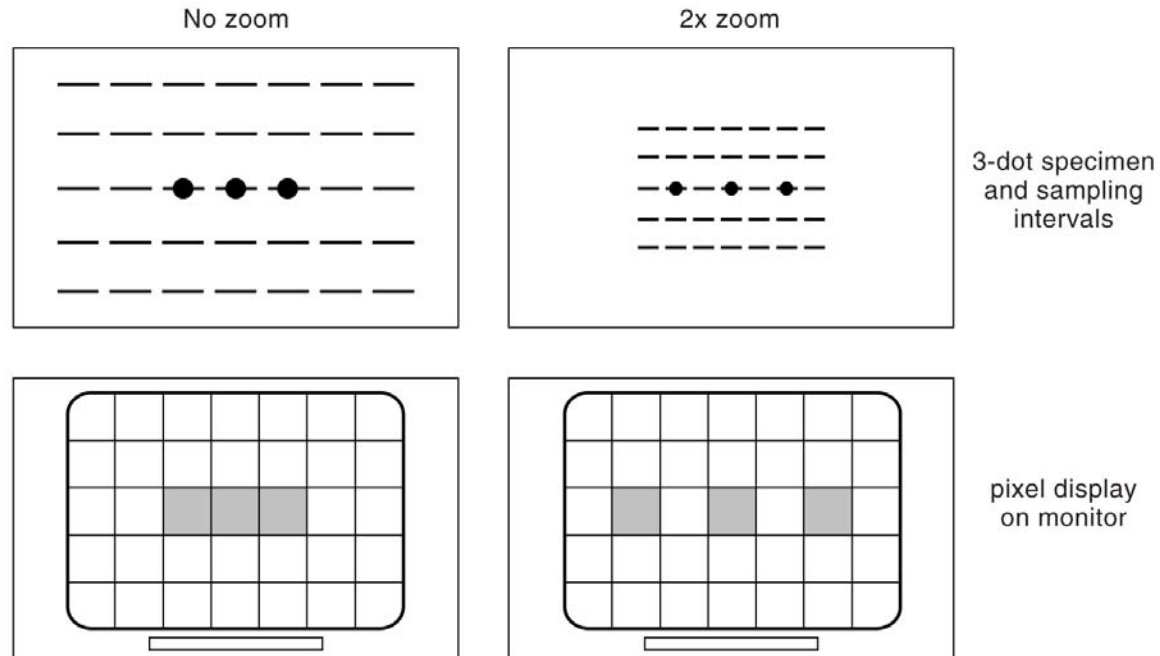


Μικρότερη ταχύτητα σάρωσης =
καθυστερεί η δέσμη laser περισσότερο
χρόνο σε κάθε σημείο του
παρασκευάσματος (ρύθμιση ταχύτητας
ηλεκτρονικά)

- Μικρότερη ταχύτητα σάρωσης =
μεγαλύτερη ένταση σήματος

- Μικρότερη ταχύτητα σάρωσης = πιο
γρήγορη εξασθένιση του σήματος από
τη συνεχή έκθεση του χρωμοφόρου σε
ακτίνα laser υψηλής εντάσεως
(photobleaching)

Ρύθμιση του zoom της εικόνας



- Αυξάνοντας το ηλεκτρονικό zoom της εικόνας (ρύθμιση ηλεκτρονικά) η δέσμη laser σαρώνει μικρότερη περιοχή του παρασκευάσματος
- Επειδή η zoomed εικόνα έχει ίδιο αριθμό pixels, η εικόνα εμφανίζεται μεγεθυμένη στην οθόνη
- Το πόσο «ωφέλιμη» είναι η μεγέθυνση (zoom) εξαρτάται από το αριθμητικό άνοιγμα του φακού

Ρύθμιση της ποιότητας της εικόνας κατά τη συνεστιακή μικροσκοπία

Παράμετρος	Αποτέλεσμα	
	Ένταση φωτός	Διακριτική ικανότητα
Αύξηση της διαμέτρου της Pinhole	Αύξηση	Μείωση
Αύξηση του zoom	Αύξηση	Αύξηση*
Αύξηση της ταχύτητας σάρωσης	Μείωση	Ίδια
Αύξηση του NA του αντικειμενικού φακού	Αύξηση	Αύξηση

Πλεονεκτήματα της συνεστιακής μικροσκοπίας σε σύγκριση με τη μικροσκοπία φθορισμού ευρέως πεδίου

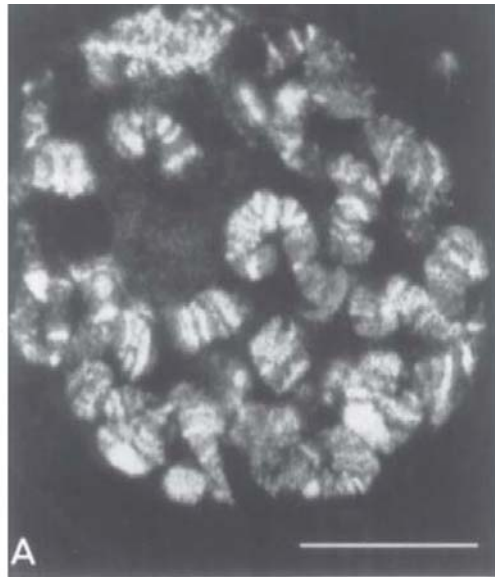
- Μπορούμε να δούμε με ευκρίνεια οπτικές τομές σε παρασκευάσματα με πάχος 10-80 μm (π.χ. ιστολογικές τομές)
- Καλύτερη ευκρίνεια εικόνας ακόμα και σε λεπτά παρασκευάσματα (π.χ. λεπτή στρώση κυττάρων)
- Παίρνοντας «στοίβα» τομών κατά τον κατακόρυφο άξονα (z-stacks) μπορούμε να επιτύχουμε προβολή των οπτικών τομών σε ένα επίπεδο, τρισδιάστατη απεικόνιση, περιστροφή, εγκάρσια όψη του παρασκευάσματος, κ.ά.

Συνηθισμένες εφαρμογές της συνεστιακής μικροσκοπίας

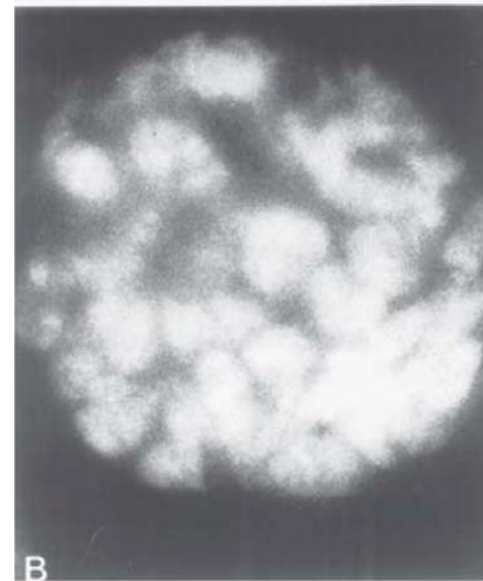
- Παρατήρηση φθορίζοντων βιολογικών δομών
- Λεπτομερής παρατήρηση ενδοκυτταρικών δομών όπως μεμβράνες, κυτταροσκελετός, χρωματίνη, λυσοσώματα, κ.ά.
- Ακριβής εντοπισμός μακρομορίων στο κύτταρο
- Συνεντοπισμός μακρομορίων (π.χ. πρωτεϊνών) στο κύτταρο
- Παρατήρηση μονιμοποιημένων δειγμάτων
- Παρατήρηση ζωντανών κυττάρων με βιντεομικροσκοπία (GFP-σημασμένα μακρομόρια)

Παρατήρηση πολυταινικών χρωμοσωμάτων με συνεστιακή μικροσκοπία

confocal



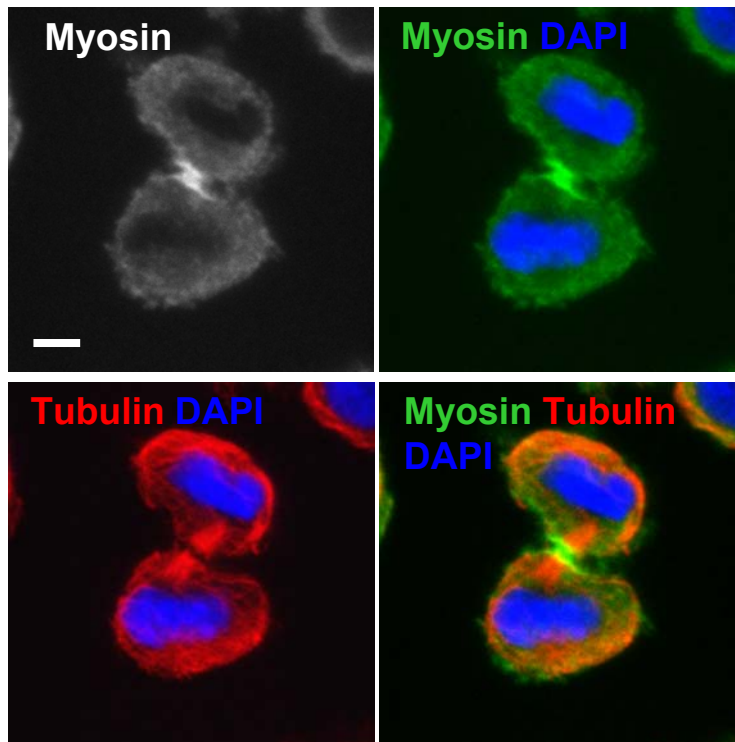
Wide-field



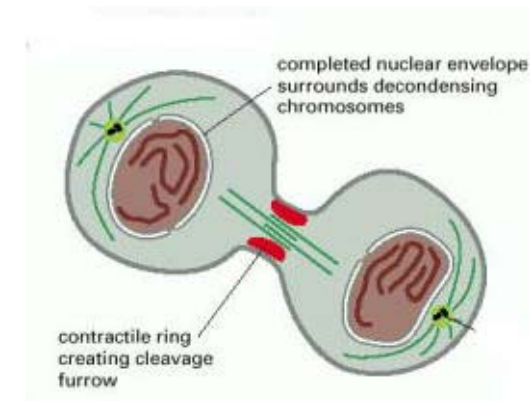
Πολυταινικά χρωμοσώματα σε πυρήνα κυττάρου σιελογόνου αδένου *Drosophila*. Χρώση με chromomycin A3. Δείχνεται ένα οπτικό επίπεδο, Bar: 10 μm

Μελέτη του εντοπισμού πρωτεϊνών κατά την κυτταροκίνηση με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας

Late Cytokinesis

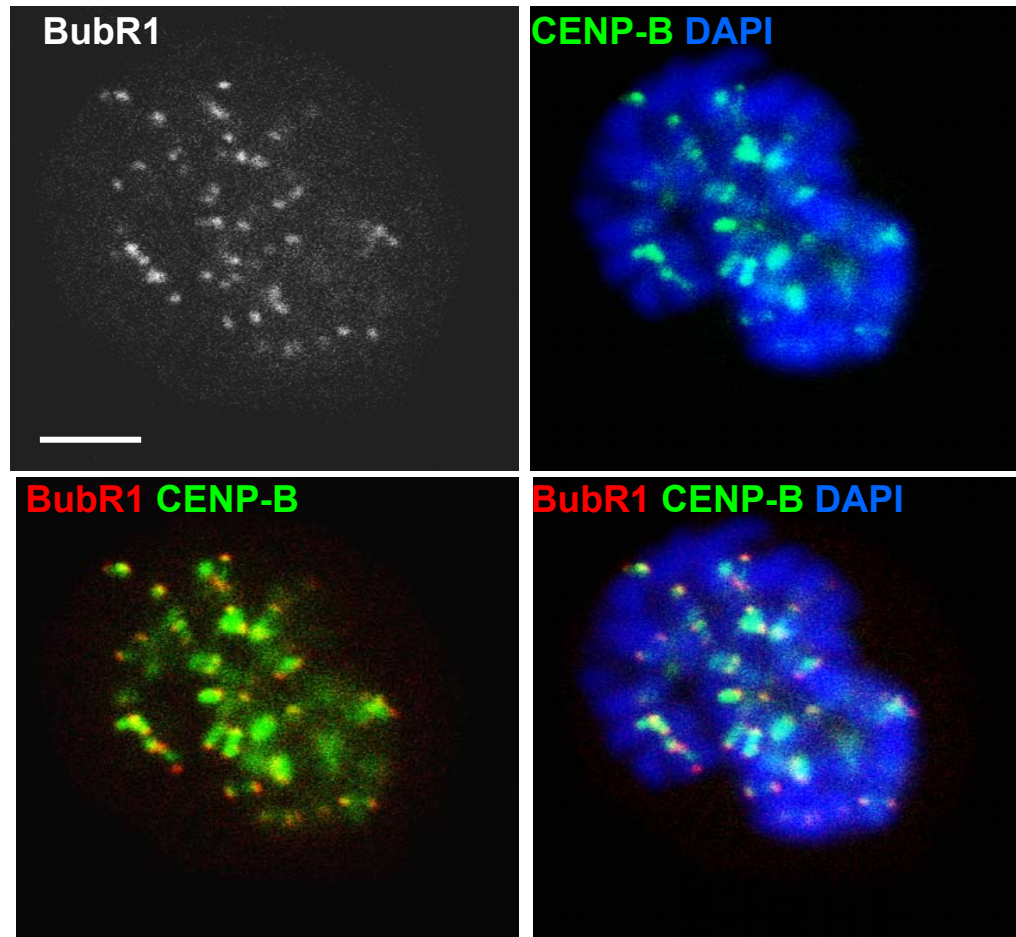


Late Cytokinesis



Μελέτη συνεντοπισμού (colocalisation) πρωτεϊνών με συνεστιακή μικροσκοπία

Προμετάφαση



Τεχνικές Μικροσκοπίας Φθορισμού

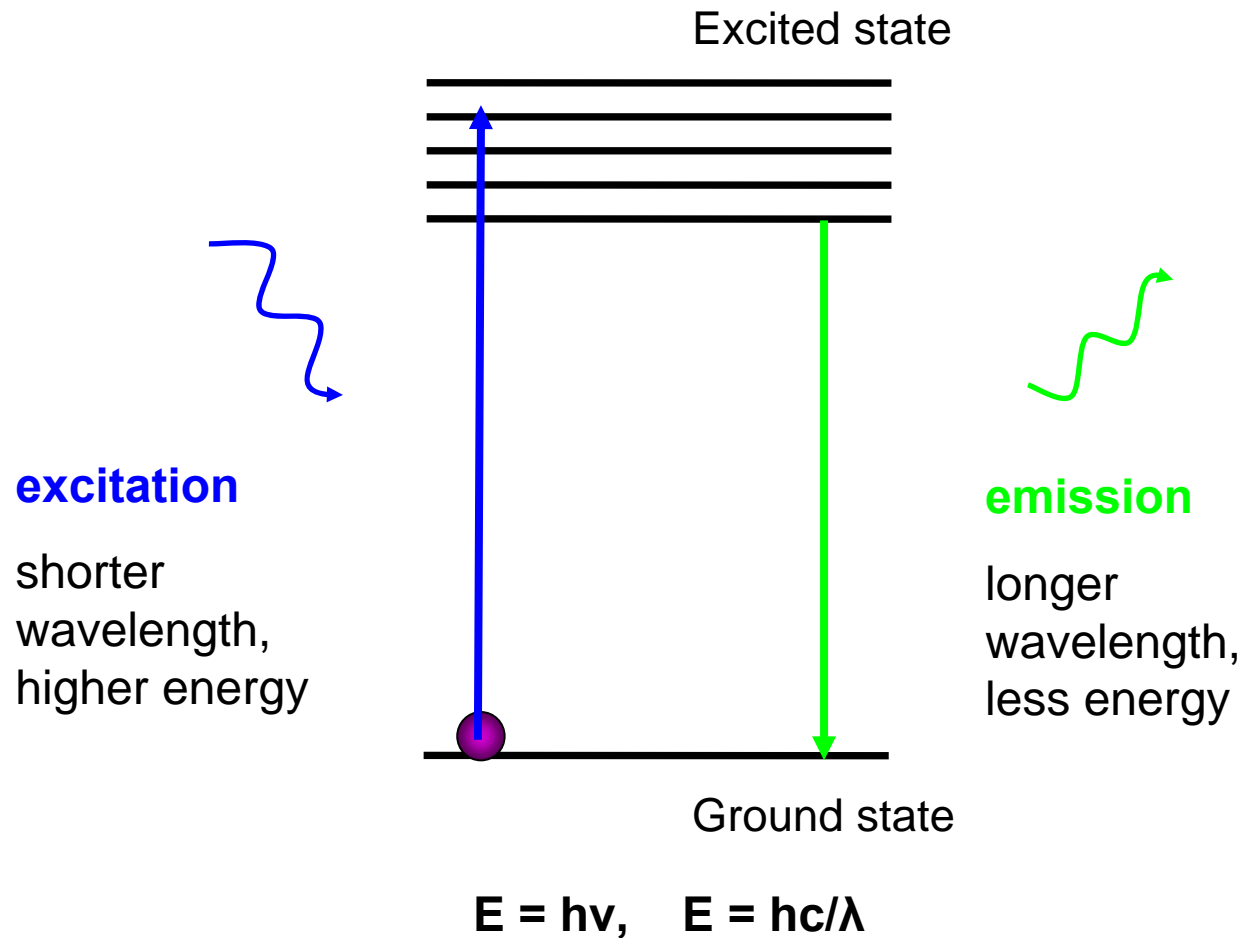
- **Κλασσικές τεχνικές**

- » Wide-field fluorescence microscopy (ή απλά fluorescence microscopy)

- » Confocal laser scanning microscopy (Συνεστιακή Μικροσκοπία)

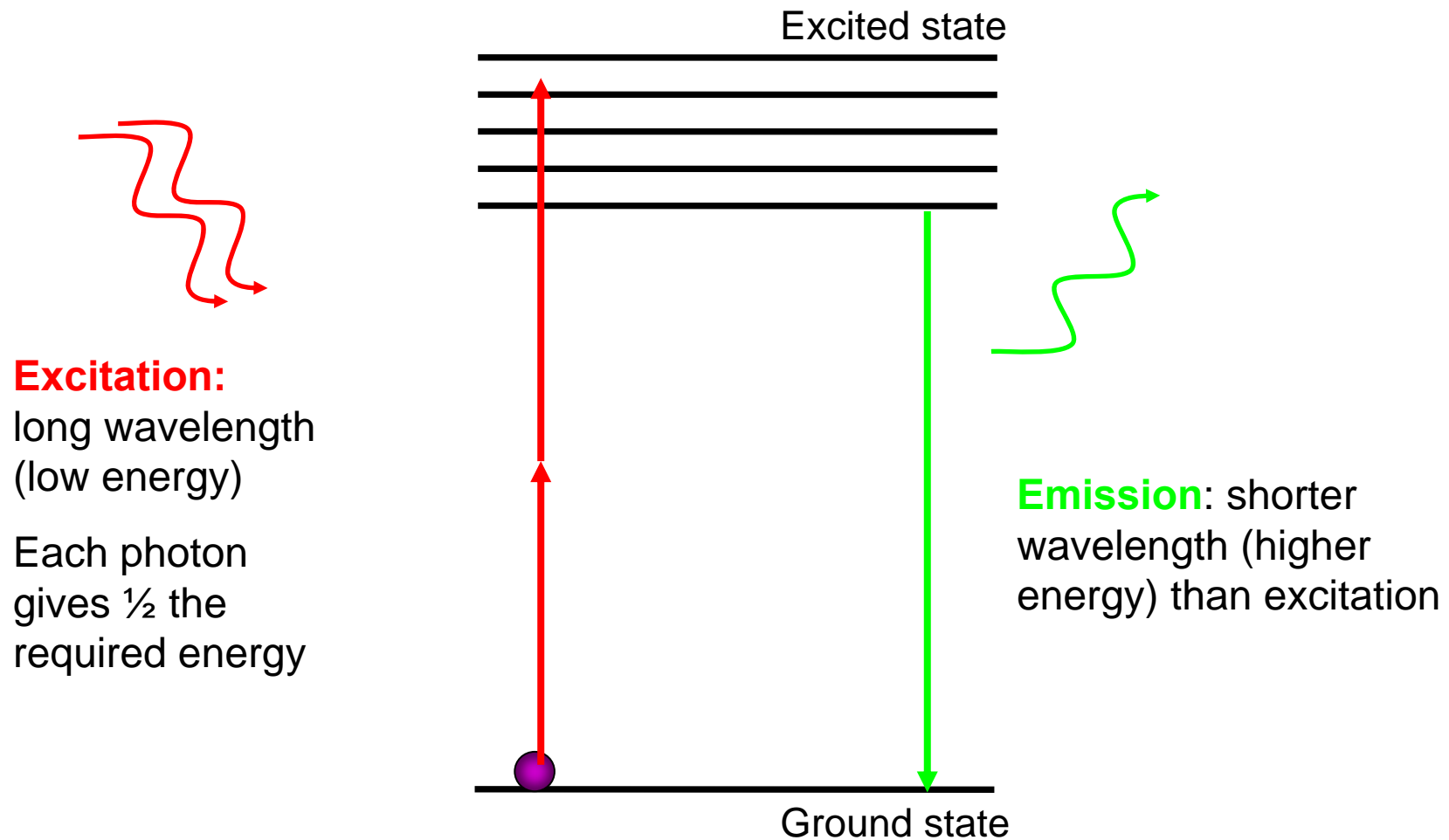
- » **2-photon microscopy**

Φθορισμός



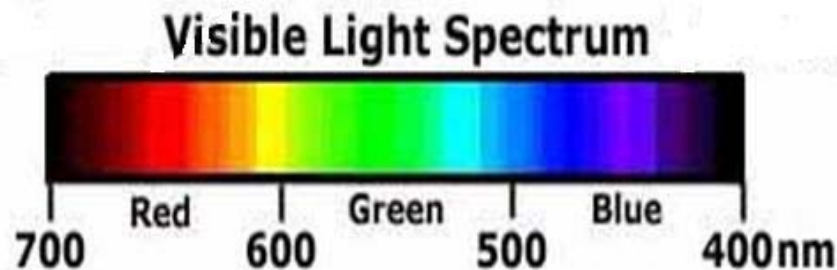
Η ίδια ενέργεια διέγερσης E μπορεί να επιτευχθεί με δύο φωτόνια, κάθε ένα από τα οποία έχει τη μισή συχνότητα (ή το διπλάσιο μήκος κύματος) ενός φωτονίου διέγερσης, $E = h(\nu/2 + \nu/2)$

2-photon microscopy



Χαρακτηριστικά της 2-photon microscopy

→ Χρησιμοποιούνται ακτινοβολίες μεγαλύτερου μήκους κύματος (στο υπέρυθρο) και άρα μικρότερης ενέργειας από τα άλλα είδη μικροσκοπίας φθορισμού



1-photon: 488nm

2-photon: 843nm

❖ Η δέσμη laser πρέπει να είναι πολύ στενά εστιασμένη διότι με μια πιο διάχυτη δέσμη η πιθανότητα το ίδιο χρωμοφόρο να δεσμεύσει δεύτερο φωτόνιο όσον χρόνο είναι διεγερμένο από το πρώτο, είναι αμελητέα

❖ Διέγερση με 2 φωτόνια συμβαίνει μόνο στο επίπεδο εστίασης, άρα δεν χρειάζεται pinhole

Πλεονεκτήματα της 2-photon ως προς την confocal microscopy

- Σε λεπτά δείγματα (10- 50 μm), για παράδειγμα λίγες στρώσεις κυττάρων, η ευκρίνεια και των δύο μεθόδων είναι παρόμοια. Όμως το photobleaching φθοριζόντων μορίων πάνω και κάτω από το επίπεδο εστίασης είναι πολύ μικρότερο στη 2-photon
- Η υπέρυθη ακτινοβολία διαπερνά μεγαλύτερο πάχος παρασκευάσματος από αυτήν μεγαλύτερης συχνότητας
- Είναι λιγότερο φωτοτοξική λόγω μικρότερης ενέργειας

Η 2-photon χρησιμοποιείται για απεικόνιση παχέων ιστών (deep tissue imaging) βάθους έως 1 mm σε ζωντανούς οργανισμούς (*in vivo* imaging)

Παραδείγματα εφαρμογών της 2-photon microscopy

- Παρατήρηση ζωντανών εμβρύων

Έμβρυα ποντικού βιάφτηκαν με μη τοξική φθορίζουσα χρωστική η οποία δεσμεύεται στα μιτοχόνδρια και μελετήθηκαν σε πειράματα κυτταροκαλλιέργειας

Με παρατήρηση με confocal microscopy η ανάπτυξη του εμβρύου σταμάτησε μετά από λίγα λεπτά

Με 2-photon-microscopy τα έμβρυα επέζησαν και η ανάπτυξή τους μελετήθηκε επί 2 περίπου ημέρες

Παραδείγματα εφαρμογών της 2-photon microscopy

