

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕ-
РАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕР-
СИТЕТ ИМЕНИ академика С.П. Королева»
(Самарский университет)

Флуоресцентная конфокальная микроскопия

Самара 2017

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕ-
РАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕР-
СИТЕТ ИМЕНИ академика С.П. Королева»
(Самарский университет)

Флуоресцентная конфокальная микроскопия
методические указания к лабораторным работам

Самара 2017

УДК 535.8

Составители: П.Е.Тимченко, Е.В.Тимченко

Рецензент: к.т.н., Ендуткина Е.А.

Флуоресцентная конфокальная микроскопия: метод. указ. / сост. П.Е. Тимченко, Е.В. Тимченко – Самара: Изд-во Самарский университет, 2017. – 74 с: ил.

Описаны принципы конфокальной микроскопии, а также применение этого метода для получения микроизображений различных объектов.

Методические указания предназначены для студентов дневного отделения Самарского университета, обучающихся по специальностям 12.04.04 «Биотехнические системы и технологии», 03.04.01 «Прикладные математика и физика» по дисциплине «Микроскопия»

© Самарский университет, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

2.1 Устройство и работа микроскопа	11
2.2 Программное обеспечение	13
3.1 Спектральный диапазон	16
3.2 Разрешающая способность	18
3.3 Увеличение ЛСКМ	20
3.4 Формат (scan format, frame size)	21
3.5 Время и скорость сканирования	21
3.6 Выбор объектива.....	22
3.7 Оптическое и электронное увеличение	22
3.8 Усиление фотоприемника. Подавление шумов	23
3.9 Разрешающая способность ЛСКМ и преобразования сигнала ²⁴	
3.10 Конфокальная диафрагма.....	25
3.11 Мощность и длина волны и лазера.....	26
3.12 Использование ртутной лампы.....	27
3.13 Серии срезов.....	27
3.14 Сканирование по длине волны	28
3.15 Временные последовательности.....	28
3.16 Компьютеры и программное обеспечение	28
1 Порядок выполнения лабораторной работы	30
2 Контрольные вопросы	41
1 Информации по программному обеспечению по обработке полученных изображений	43
1.1 Общая информация.....	43
1.2 Общая информация о программе ImageJ.....	44
1.3 Уменьшение шумов и увеличение контрастности изображений	45
2 Порядок выполнения лабораторной работы	49
3 Контрольные вопросы:	53
1 Теоретические основы.....	55
2 Порядок выполнения лабораторной работы	55
3 Контрольные вопросы	61
1 Теоретические основы.....	62
2 Порядок выполнения лабораторной работы	63
3 Контрольные вопросы	69

1 Принципы конфокальной микроскопии

Конфокальная микроскопия - это один из методов световой микроскопии, а конфокальный микроскоп - оптический прибор, поэтому на него распространяется ряд ограничений, присущий таким приборам, например, дифракционные эффекты, зависящие от длины волны излучения. Один из недостатков обычного светового микроскопа - внефокусные лучи, которые снижают контраст изображения (рис.1.1а). Если в оптическую схему микроскопа ввести специальную диафрагму, расположенную в плоскости промежуточного изображения, то она пропустит только те световые лучи, которые исходят из очень небольшой области объекта (рис. 1.1б). Диафрагма будет играть роль пространственного фильтра. Чем меньше диаметр диафрагмы, тем меньше размеры этой области.

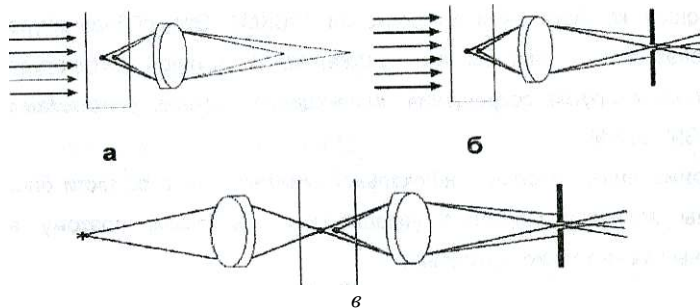


Рисунок 1 - Пространственная фильтрация световых лучей с помощью конфокальной диафрагмы

Однако в этом случае мы получим изображение только одного элементарного объема, причем необязательно освещать весь объект, достаточно освещение именно этого объема (рисунок 1в). Полное изображение объекта в конфокальном микроскопе формируется при последовательном просмотре этих элементарных объемов с применением различных сканирующих систем. Накопление информации происходит либо благодаря свойству инерционности зрения при быстром сканировании, либо посредством использования фотоприемников и электронных запоминающих устройств. Таким образом, конфокальная микроскопия обеспечивает увеличение контраста изображения за счет фильтрации внефокусных лучей.

Для того, чтобы регистрировать свет только от одной точки после объективной линзы располагается диафрагма малого размера таким образом,

что свет, испускаемый точкой фокальной плоскости (рисунок 2), проходит через диафрагму и будет зарегистрирован, а свет от точек перед и за фокальной плоскостью в основном задерживается диафрагмой и ослабляется в десятки раз. Вторая особенность, повышающая контрастность изображения, расположенного в фокальной плоскости, состоит в том, что осветитель создает не равномерную освещенность поля зрения, а фокусирует свет в анализируемую точку. Это может достигаться расположением второй фокусирующей системы за образцом, но при этом требуется, чтобы образец был прозрачным. Кроме того, объективные линзы обычно сравнительно дорогие, поэтому использование второй фокусирующей системы для подсветки мало предпочтительно. Альтернативой является использование светоделительной пластинки, так чтобы и падающий и отраженный свет фокусировались одним объективом (рисунок 2). Такая схема к тому же облегчает юстировку, а полноценное изображение строится путем сканирования (движения образца или перестройки оптической системы).

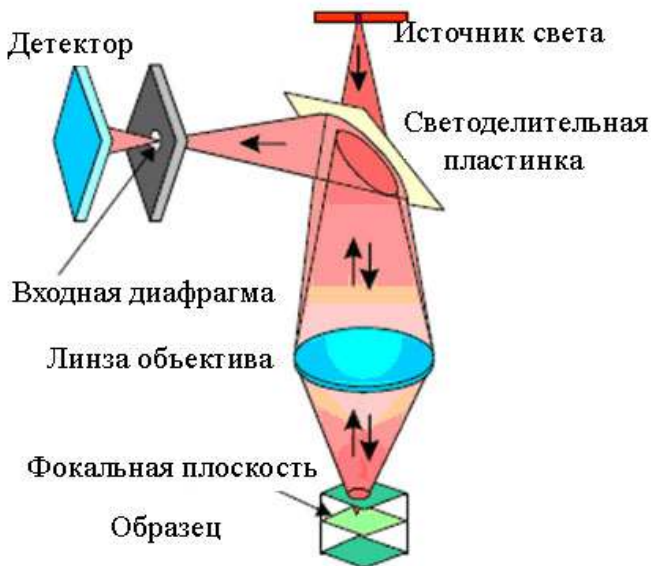


Рисунок 2 – Принцип конфокальной микроскопии

Рассмотрим теперь математически, каким образом и насколько количественно изменяется контрастность при применении конфокальной

микроскопии. Во-первых, так как в конфокальном микроскопе свет дважды проходит через объектив, то функция размытия точки (далее обозначаемая PSF, см. определение в предыдущем пункте) имеет вид

$$P_{\text{conf}}(\xi, \rho) = p(\xi, \rho) \times p(\xi, \rho) \quad (1)$$

Для качественного понимания удобно рассматривать каждую PSF как вероятность того, что фотон попадет в точку с координатами (ξ, ρ) , либо что фотон будет зарегистрирован из точки с координатами (ξ, ρ) , тогда конфокальная PSF есть произведение независимых вероятностей. На рисунке 3 приведено изображение обычной PSF и конфокальной PSF.

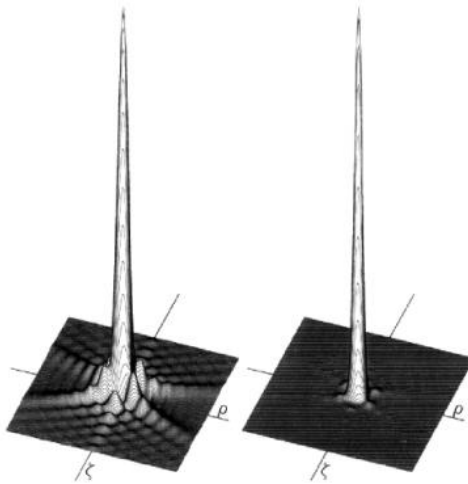


Рисунок 3 - Конфокальная PSF показана справа, а обычная PSF – слева [1]

Если использовать критерий Релея для разрешения (провал 26% от максимума распределения), то мы получим, что разрешение в конфокальном микроскопе увеличивается, но не существенно. Для конфокального микроскопа

$$r_{\text{conf}} = 0.44 \frac{\lambda}{n \sin \theta} = 0.88 \frac{\lambda'}{D} F \quad (1)$$

в то время как для обычного микроскопа

$$r_{\text{resel}} = 0.61 \frac{\lambda}{n \sin \theta} = 1.22 \frac{\lambda'}{D} F \quad (2),$$

где $\lambda' = \lambda/n$.

Однако основным достоинством конфокального микроскопа является не увеличение разрешения в смысле критерия Релея, а существенное увеличение контрастности. В частности для обычной PSF в фокальной плоскости отношение амплитуды в первом боковом максимуме к амплитуде в центре составляет 2%, для случая конфокального микроскопа это отношение будет 0.04%. На рисунке 4 приведен практический пример, когда это важно. На верхней части рисунка мы видим, что тусклый объект (интенсивность в 200 раз меньше, чем у яркого) невозможно обнаружить в обычный микроскоп, хотя расстояние между объектами существенно больше того, что предписано критерием Релея. В то же самое время, в конфокальный микроскоп (нижняя часть рисунка 3) данный объект должен хорошо регистрироваться.

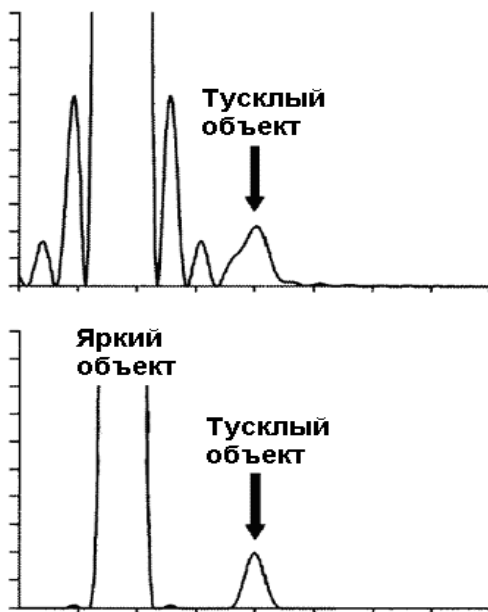


Рисунок 4 - Распределение интенсивности для случая обычного микроскопа (вверху) и конфокального микроскопа (внизу). Максимум интенсивности тусклого объекта в 200 раз меньше, чем интенсивность яркого [1]

В результате такая система обладает хорошим разрешением в направлении оптической оси и путём смещения объекта относительно фокальной плоскости позволяет сканировать послойно объект, платой при этом

является необходимость применения достаточно сложных схем сканирования либо образцом, либо световым пучком [2-11]. Преимущество такой системы очевидно, так как нет необходимости разрезать объект на слои и фиксировать их, а это всегда ведёт к разрушению клеток объекта и изменению их характеристик.

Конфокальная микроскопия обеспечивает увеличение контраста изображения за счет применения сфокусированной подсветки в области анализа и диафрагмирования излучения в плоскости наблюдения. Такое увеличение контрастности приводит к возможности разрешения объектов, имеющих разницу в интенсивности до 200:1, а также обеспечивает повышение разрешения, как в плоскости объекта, так и вдоль оптической оси. Наряду с повышением контрастности флуоресцентная конфокальная микроскопия позволяет обеспечивать покомпонентную трехмерную реконструкцию исследуемого объекта за счет использования многочастотной подсветки.

Среди наиболее передовых методик сканирующей конфокальной микроскопии следует выделить использование сканирующего диска с микродиафрагмами (рисунок 5).

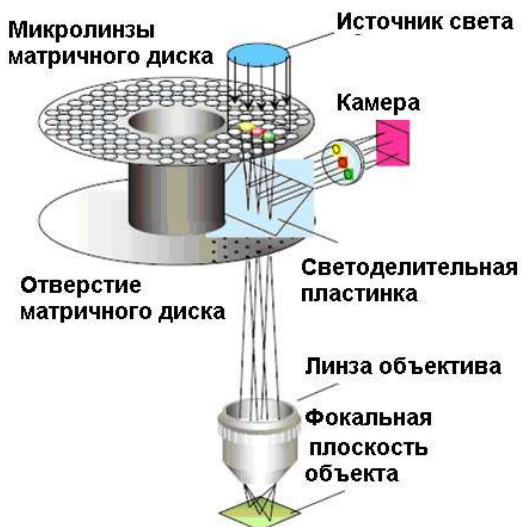


Рисунок 5 - Сканирующего диска с микродиафрагмами

Таким образом, современный ЛСКМ имеет следующие основные узлы: микроскоп, сканирующий блок, осветительный блок (лазеры), компьютер со специальным программным обеспечением.

Основными преимуществами конфокальной микроскопии по сравнению с обычной световой микроскопией являются:

1. Высокая контрастность изображения.
2. Улучшенная разрешающая способность (латеральная в 1.4 раза, аксиальная - в зависимости от размера конфокальной диафрагмы).
3. Получение «оптических срезов», трехмерная реконструкция.
4. Мультиспектральные исследования с высокой степенью разделения сигналов от разных флуорохромов.
5. Возможности применения методов цифровой обработки изображений.

К недостаткам конфокальной микроскопии можно отнести:

1. Сложность настройки прибора.
2. Отсутствие в ЛСКМ «оптического» изображения. Оно существует только в цифровой форме и отображается на экране монитора.
3. Высокая стоимость оборудования и его эксплуатации.

2 Работа микроскопа

2.1 Устройство и работа микроскопа

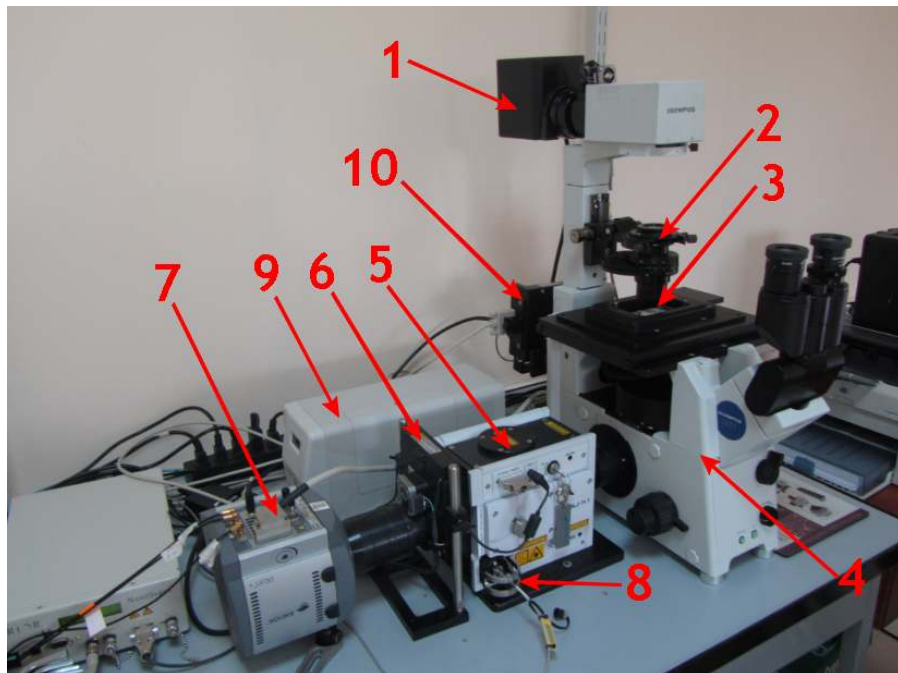


Рисунок 6 – Внешний вид микроскопа: галогеновая лампа 1, конденсор 2, объект 3, микроскоп 4, конфокальный блок 5, фильтрующий блок 6, камера 7, волоконный вывод блока лазеров 8, ртутная лампа 9, волоконный вывод ртутной лампы 10

Устройство микроскопа представлено на рисунке 6. Он обладает следующими характеристиками:

Микроскоп:

- окуляры 12,5х
- объективы 20х, 40х
- источник видимого диапазона 100Вт (галогеновый),
- ртутная лампа 100Вт,
- блок для 6 фильтрубов (установлен блок для наблюдения люминисценции от ртутной лампы в зелёной и синих областях),

- 2 моторизированных барабана фильтров для изучения флюоресценции (Fluorescence 525/50 и 617/73).

Цифровая камера:

- разрешение 1004*1002,
- время экспозиции 34мс-10мин,
- захлаживание матрицы до -75 С,

Блок лазеров:

- модули 488 нм, 561нм с возможностью плавной перестройки мощности с шагом 0,1%,
- стабильность энергии излучения на уровне 0,5%,

Модуль Z-сканирования:

- диапазон 100мкм,
- шаг 0,01 мкм,
- скорость сканирования до 25 слоёв в секунду.

Конфокальный блок по принципу диска Нипконова:

- волоконный ввод лазерного излучения для пропускания через диафрагмы.

Модуль синхронизации:

- возможность синхронизировать работу лазера в моменты открытия диафрагмы камеры

В режиме конфокальной микроскопии свет от галогеновой лампы 1 (видимый диапазон) поступает на конденсор 2, который фокусирует излучение на объекте 3. Прошедшее через объект (рассеянное вперед) излучение собирается объективом (20x или 40x) и через систему зеркал и призм микроскопа 4 вводится в сканирующий конфокальный блок 5. Сканирующий конфокальный блок построен по принципу Нипкова [8]: вращающиеся диски с микродиафрагмами, реализующими конфокальный метод. Перемещение фокальной плоскости (выделение анализируемого слоя ткани) осуществляется за счёт управляемого с компьютера пьезоэлектрического z-микросканера, с установленном на нем объектом исследования. Спектральная фильтрация излучения осуществляется в блоке 6, реализованным в виде системы сменных фильтров, установленных на вращающейся турели. Спектральная фильтрация позволяет повысить контрастность регистрируемого изображения. После блока 6 излучение вводится в камеру 7 (1024*1024, время экспозиции 40мс-10мин). Для снижения темновых токов (в среднем на 3 порядка) матрица камеры охлаждается до температуры -75 С.

В режиме флуоресценции галогеновая лампа выключена. Вместо неё используется либо 4х модульный блок лазеров с волоконным выводом 8 (в настоящей работе использовались каналы излучения с длинами волн 488 нм и 561нм), либо ртутная лампа 9. В обоих случаях используется волоконный ввод 8 или 10, а мощность лазерных источников управляется с компьютера (с шагом 0,1%). Фокусировка и согласование падающего излучения осуществляется в блоке 5 при помощи вращающегося диска с микролинзами, синхронизованного с диском Нипкова.

Использование такой аппаратуры имеет следующие преимущества по сравнению с обычной световой и флуоресцентной микроскопией. Сканирующий конфокальный блок, реализующий конфокальный метод, позволяет выделять и анализировать несколько слоев в одном и том же препарате. Конфокальная микроскопия в видимом свете также дает возможность проводить динамическое наблюдение за живыми системами *in vitro*.

При нанесении на препарат флюорофора он селективно впитывается биообъектом, что позволяет выделять не только клетки, но и обеспечивать визуализацию ядра или различных клеточных органелл. За счёт того, что подсветка возбуждающим лазером производится со стороны объектива, а флюорофор содержится только в клетках, фоновое излучение становится теоретически равным нулю, а, значит, контрастность изображения равной единице.

Камера передаёт изображение на ПК, с ПК также осуществляется управление большинством настроек оборудования.

2.2 Программное обеспечение

Программное обеспечение (ПО) при открытии представляет 2 окна:

- основное окно (рисунок 7)
- окно изображений (рисунок 8)

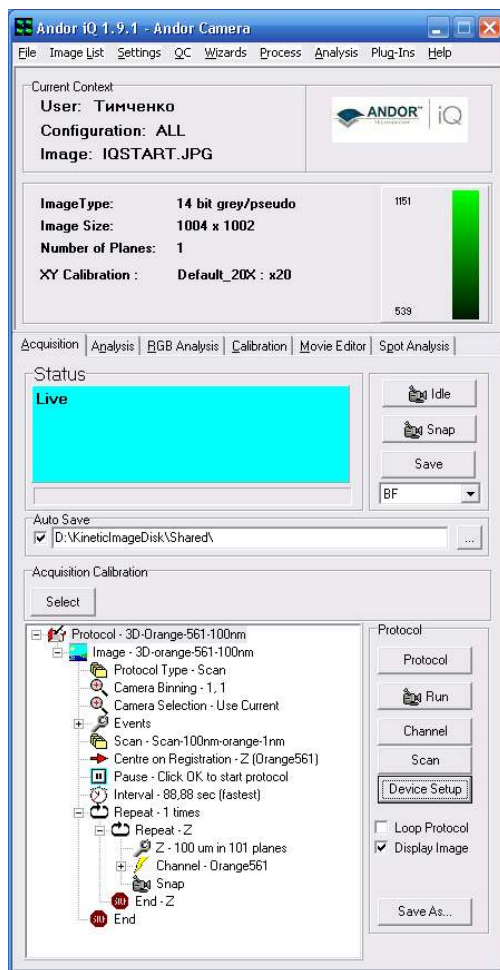


Рисунок 7 - основное окно ПО

В основном окне производятся все настройки. Окно же изображений позволяет видеть изображение динамически с камеры или сохранённое в память ПК. В этом окне можно задать настройки отображения изображения, переключить режим изображения, а также управлять настройками микроскопа, каналами формирования и захватом изображения.

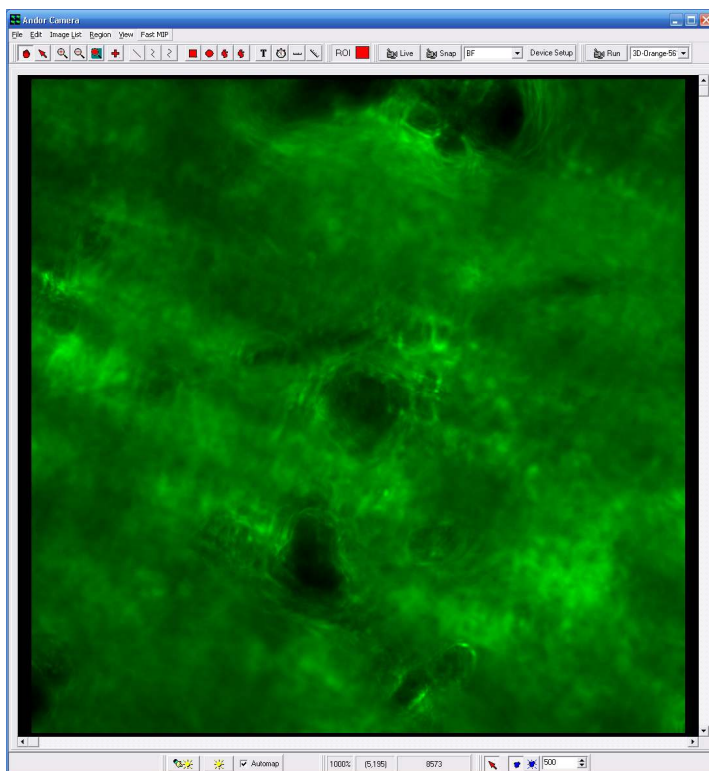


Рисунок 8 - Окно изображений

3 Основные характеристики лазерного конфокального микроскопа

Как уже указывалось, современные конфокальные микроскопы конструируются на базе серийных исследовательских люминесцентных микроскопов. Поэтому, прежде всего, важно знать основные параметры этих микроскопов:

1. Прямой или инвертированный микроскоп.

Прямой микроскоп, у которого объектив находится сверху препарата, позволяет исследовать объекты на стандартных предметных стеклах, в то время как на инвертированном микроскопе за счет расположения объектива снизу можно наблюдать как фиксированные препараты на предмет-

ных стеклах, так и живые объекты, находящиеся в жидкой среде (в специальных чашках или кюветах).

2. Набор объективов.

Они могут быть как универсальными, так и специализированными для конфокальной микроскопии. Основными параметрами объективов являются их увеличение и числовая апертура. Важны также толщина покровного стекла (или его отсутствие), на которую объективы рассчитаны, тип иммерсии, рабочее расстояние, типы оптической коррекции, спектральный диапазон и ряд других характеристик. Основные параметры обычно указываются специальными символами на корпусе объектива. Условные обозначения можно посмотреть в [12], а также на сайте <http://www.microscopyu.com/>.

3. Методы контрастирования, например, фазовый контраст, дифференциальный интерференционный контраст (ДИК). Эти режимы используются для поиска объектов, так как в конфокальном режиме часто это делать неудобно, а в режиме люминесценции при визуальном наблюдении происходит «выцветание» препарата вследствие фотохимических реакций.

Некоторые ЛСКМ имеют т.н. детектор проходящего света, что дает возможность получения изображения с использованием ДИК. Такой режим позволяет получить изображение того же формата, что и конфокальное, и наложить одно на другое.

4. Степень моторизации. Для переключения режимов работы удобно иметь микроскоп, управляемый от компьютера (переключение объективов, фокусировка, управление фильтрами и светоделительными зеркалами, источниками света, движение столика и т.д.).

3.1 Спектральный диапазон

Большинство современных ЛСКМ рассчитаны на работу в широком спектральном диапазоне видимого света и даже ближнего ИК и УФ диапазона.

Часто они имеют несколько приемных каналов для одновременного сканирования в нескольких спектральных областях. Важным фактором является состав лазерного блока, который может иметь несколько лазеров для возбуждения люминесценции флуорохромов в разных областях спектра.

Желательно, чтобы спектральная линия лазера попадала на максимум спектра поглощения флуорохрома. Мощность излучения лазеров также имеет существенное значение. В ЛСКМ используются в основном лазеры непрерывного излучения, однако для специальных приложений, например в мультифотонной микроскопии, используются и импульсные лазеры (таблица 1).

Таблица 1 - Основные типы лазеров для конфокальной микроскопии

Тип лазера	Длина волны излучения, нм	Максимальная мощность, мВт
Ar - UV	351, 364	80
Диодный (п/п)	405	50
He-Cd	442	30
Ar-Kr	488, 568, 647	125
Ar	458, 477, 488, 496, 514	200
He-Ne	543	1,5
Kr	568	40
He-Ne	594	4
He-Ne	633	15
Ti-Sapphire, импульсный	720 - 1000	1 (средняя мощн.)

Таблица 2 – Спектры некоторых флуорофоров

Флуоро-хром	Макс. возбужд. нм	Макс. испуск. нм
Acridine orange.	502 ДНК 460 РНК	526 650
Auramine	460	550
Cy2	489	506
Cy3	514,552	566,570
Cy5	650	667
Cy3/Cy5		
DRAQ5	647	670
Eth.brom.	510	605
FITC	490	520
FITC/Cy3		
FITC/Cy5		
Pr.iodide	535	617
Rhodam.	550	573
Texas Red	596	620
TOTO-3	642	660
TRITC	541	572

Наборы фильтров и зеркал для разделения возбуждения и люминесценции, а также разделения приемных каналов должен соответствовать

характеристикам флуорохромов. В таблице 2 представлены в качестве примера данные некоторых флуорофоров. Основными характеристиками являются длины волн максимумов возбуждения и испускания при этом полосы возбуждения и испускания могут быть как и узкими, так и широкими.

В некоторых моделях конфокальных микроскопов приемные каналы построены по принципу призмного спектрофотометра (например, LEICA TCS SP, LSM 510 META), что позволяет плавно менять спектральный диапазон регистрации исходя из поставленной задачи, а также исследовать спектры испускания флуорохромов.

3.2 Разрешающая способность

Разрешающая способность микроскопа (resolution) – одна из его важнейших характеристик, определяющая качество изображения. Под разрешающей способностью микроскопа обычно понимают возможность различения двух близких по интенсивности точечных объектов. С помощью микроскопа наблюдают близко расположенные объекты, поэтому его разрешающая способность характеризуется не угловым, а линейным расстоянием между двумя близкими точками, которые еще могут восприниматься раздельно. Наблюдаемый объект располагается вблизи переднего фокуса объектива. В плоскости, геометрически сопряженной объекту, располагается его увеличенное изображение, которое рассматривается глазом через окуляр. Вследствие дифракционных явлений любой точечный объект размывается и его изображение перекрывается с изображением соседнего объекта (рисунок 9).

Из вида дифракционной картины распределения интенсивности в фокальной плоскости следует, что разрешение будет определяться степенью перекрытия центральных пятен распределений двух точечных объектов. Эти пятна называются дисками Эйри. Рэлеем был предложен критерий, согласно которому две точки считаются разрешенными, когда на изображении максимум интенсивности от 1-ой точки попадает на минимум от 2-ой. При этом величина "провала" в интенсивности по центру между изображениями точек составили 26% от максимума, а расстояние между разрешаемыми точками равно радиусу диска Эйри.

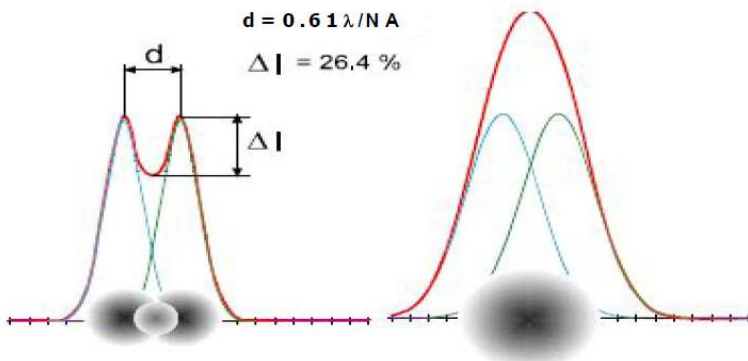


Рисунок 9 - Предел оптического разрешения микроскопа

Впервые предел разрешения объектива микроскопа был определен немецким физиком Г. Гельмгольцем на основании критерия Рэля. Формула Гельмгольца имеет вид [13]:

$$d = 0.61 \lambda / NA$$

Здесь λ – длина волны, величина $NA = n \sin \alpha$ называется числовой апертурой объектива, n – показатель преломления иммерсионной жидкости, α – так называемый апертурный угол.

У хороших объективов апертурный угол α близок к своему пределу: $\alpha \approx \pi / 2$. Как видно из формулы Гельмгольца, применение иммерсии несколько улучшает предел разрешения. Полагая для оценок $\sin \alpha \approx 1$, $n \approx 1.5$, получим: $d \approx 0.4 \lambda$.

Таким образом, с помощью микроскопа принципиально невозможно рассмотреть какие-либо детали, размер которых значительно меньше длины волны света. Волновые свойства света определяют предел качества изображения объекта, полученного с помощью любой оптической системы.

Необходимо заметить, что в научной литературе существует неоднозначность в терминологии. Так параметр d называют пределом разрешения, условием разрешения, разрешением и даже разрешающей способностью. Между тем, разрешающая способность определяет положительные качества микроскопа. Поэтому параметр, ее характеризующий, должен увеличиваться с улучшением разрешающей способности, в то время как d – чем меньше, тем лучше. Можно характеризовать разрешающую спо-

способность не пределом разрешения d , а разрешающей силой, которая увеличивается с улучшением разрешающей способности:

$$D = 1/d = NA / 0.61 \lambda$$

Если длина волны λ будет измеряться в [мкм], то разрешающая сила будет иметь размерность [мкм⁻¹], т.е. она будет определять количество разрешаемых точек или линий на 1 мкм.

С появлением компьютерной обработки изображений и конфокальной микроскопии были предложены и другие критерии и параметры, характеризующие разрешающую способность микроскопа, например, критерий Спарроу.

В конфокальной микроскопии в силу ряда причин для характеристики разрешающей способности применяется параметр FWHM (Full Width at Half Maximum) - полная ширина на половине высоты функции распределения интенсивности точечного источника PSF (Point Spread Function – функция «размывания» точки) (рисунок 10).

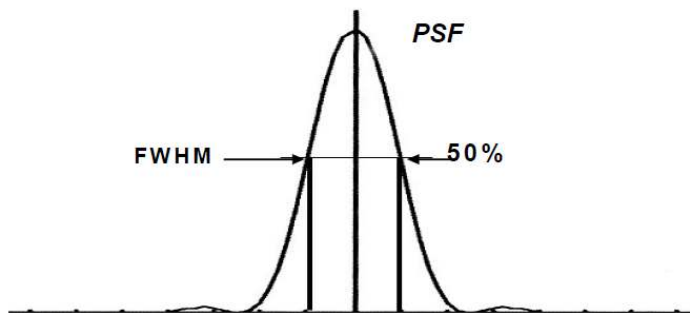


Рисунок 10 - Функция распределения интенсивности точечного источника - Point Spread Function (PSF)

3.3 Увеличение ЛСКМ

Общее увеличение системы это отношение размера изображения объекта на экране монитора или другого устройства отображения к истинному размеру объекта. Общее увеличение зависит от увеличения объектива, параметров матрицы и монитора. Можно вычислить размеры поля изображения, так например для нашей камеры размер матрицы 8x8 мм, так при использовании объектива 40x, размер области исследуемого объекта составляет 200*200 мкм. Измерив размеры окна изображения на экране,

можно легко вычислить общее увеличение. Например, размеры окна 30x30 см, тогда общее увеличение будет 1500х. То же можно сделать, используя масштабный отрезок, который выводится на изображении. Однако большого практического значения этот параметр не имеет, т.к. он зависит от размера изображения на экране или на фотоотпечатке. Важнее знать, правильно ли прокалиброван прибор, что можно проверить с помощью тест-объектов.

3.4 Формат (scan format, frame size)

Этот параметр определяет число элементов изображения (пикселей) по горизонтали и вертикали, на которые оно разбивается при сканировании.

Формат может быть квадратным (например, 512x512) или прямоугольным (например, 256x32). При уменьшении формата уменьшается время сканирования, и, следовательно, увеличивается частота смены кадров (frames), что бывает важно при исследовании быстропротекающих процессов.

3.5 Время и скорость сканирования

Время сканирования одного поля (кадра) зависит от частоты сканирования (линий в секунду) и от формата кадра. Чем больше формат (т.е. число элементов изображения – пикселей), тем оно больше. В микроскопах с ФЭУ важным параметром является также время позиционирования луча на одном пикселе - pixel dwell time. Это время также определяется частотой сканирования и форматом кадра. От pixel time зависит та энергия лазерного луча, которая попадает на препарат, и следовательно, конечная яркость изображения - чем больше время, тем больше яркость. Поэтому при недостаточной яркости изображения можно уменьшать частоту (скорость) сканирования.

Для нашего микроскопа минимальное время экспозиции 35 мс (28 кадров в секунду) для разрешения 1004 на 1002. Уменьшение площади считываемого кадра позволяет уменьшать время минимальной экспозиции и поднимать частоту считывания кадров. Время экспозиции можно увеличивать, что кратно позволяет повысить уровень сигнала при том же уровне шумов.

3.6 Выбор объектива

Одним из основных параметров объектива является числовая апертура, от которой зависит разрешающая способность как объектива, так и конфокального микроскопа в целом. Поэтому для исследования тонкой структуры объекта следует применять объективы с большой апертурой: 1.3 – 1.4. Правда в этом случае они будут иммерсионными, что затрудняет работу с ними. Выбор типа иммерсии тоже важен. Если объект исследования находится в водной среде, то применение масляной иммерсии вызовет ухудшение изображения из-за разностей показателей преломления, объективы же с водной иммерсией имеют более низкую числовую апертуру.

Поэтому сейчас разработаны объективы с глицероловой иммерсией, которые занимают промежуточное положение как по числовой апертуре, так и по показателю преломления. Они являются более универсальными в применении.

Для получения мультиспектральных конфокальных изображений важна коррекция аберраций по спектру. Так объективы апохроматы скорректированы по 3 длинам волн, т.е. практически во всем видимом диапазоне. Индекс HCX или ICS указывает на отсутствие хроматической разности увеличения. Для исследования колокализации веществ или структур эти параметры имеют существенное значение.

Индекс UV на объективе говорит о том, что его пропускание улучшено в области 350–400 нм, что может быть важно при получении изображений «синих» красителей типа DAPI или Hoechst.

Наконец, важно иметь большое рабочее расстояние объектива для того, чтобы исследовать относительно толстые объекты. К сожалению, чем больше числовая апертура, тем обычно меньше рабочее расстояние. Например, у объектива HCX PL APO 63x/1.32 OIL оно составляет всего 70 мкм! Однако, у объектива HCX PL APO 63x/1.3 GLYC рабочее расстояние 280 мкм.

3.7 Оптическое и электронное увеличение

Общее увеличение ЛСКМ зависит прежде всего от увеличения объектива и электронного увеличения (zoom). Таким образом, общее увеличение с объективом 40x и zoom=5 будет таким же, что и с объективом 100x и zoom=2.

Однако чаще всего объективы с большим увеличением имеют и большую апертуру. Поэтому для получения наилучшего разрешения при одном и том же общем увеличении в данном примере следует использовать объектив 100х.

Надо иметь также ввиду, что интенсивность люминесценции объекта (соответственно, и яркость изображения на мониторе) зависит как от увеличения объектива, так и от апертуры:

Интенсивность \sim (Апертура)⁴ / (Увеличение)²

Таким образом, при одинаковой апертуре объектив с меньшим увеличением является более предпочтительным. Например, объектив 63х/1.4 лучше, чем 100х/1.4.

Однако при выборе увеличения могут вступить в силу и другие факторы, например размеры поля сканирования, например, для получения обзорного изображения.

3.8 Усиление фотоприемника. Подавление шумов

Как и в любом электронном измерительном приборе, в ЛСКМ существуют случайные флуктуации сигнала или шумы, имеющие разнообразную физическую природу (квантовую, тепловую и т.д.). Чем меньше уровень шумов тем больше отношение сигнал/шум, и тем более качественным будет изображение в ЛСКМ.

Высокочастотные шумы (т.е. такие, у которых постоянная времени сравнима с pixel time) проявляются на изображении как яркие или темные точки размером в 1-2 пиксела. Источниками высокочастотных шумов являются лазеры, фотоприемники, электронные блоки, волоконно-оптические кабели.

Наиболее сильная зависимость уровня высокочастотных шумов - от напряжения на фотоприемниках (Detector Gain). Поэтому напряжение следует устанавливать на возможно более низком уровне, регулируя уровень сигнала мощностью лазера (однако, как указывалось выше, избегая «выгорания» препарата). Параметр Offset устанавливает пороговый уровень сигнала, что также позволяет уменьшать влияние шумов на фоновой части изображения.

Еще один эффективный способ борьбы с шумами – это использование усреднения изображения (average) по нескольким кадрам сканирования (frame). Поскольку шумы имеют случайное распределение по изображению, меняющееся от кадра к кадру, то их величина будет уменьшаться с увеличением числа усредняемых линий или кадров, а полезный сигнал

при этом остается неизменным. На рисунке 11 приведены экспериментальные данные об уровне шумов при увеличении числа усредняемых кадров, полученные на LEICA TCS SL.

Необходимое число кадров легко подобрать, наблюдая, меняется ли изображение после очередного сканирования. Если изображение перестает изменяться, то достигнуто минимально необходимое число усредняемых кадров. Излишнее число кадров приводит к увеличению времени сканирования, выгоранию препарата, а также повреждению живых объектов.

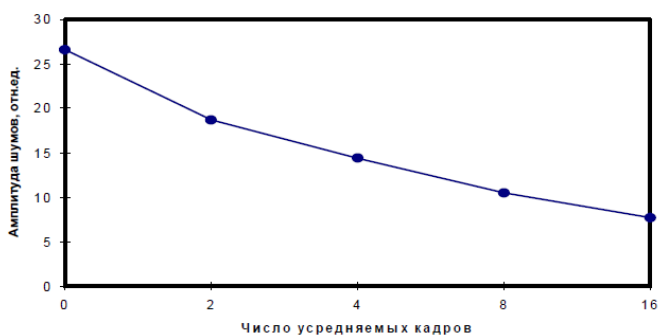


Рисунок 11 - Уменьшение амплитуды шумов на изображении при увеличении числа усредняемых кадров [14]

3.9 Разрешающая способность ЛСКМ и преобразования сигнала

Современный лазерный сканирующий конфокальный микроскоп - прибор оптико-электронный, поэтому его пространственная разрешающая способность складывается из оптической и «электронной» разрешающей способности.

В ЛСКМ происходят многократные преобразования сигнала из одной формы в другую (рисунок 12). Эти преобразования влияют на общую разрешающую способность, например, в процессе сканирования имеют значение такие параметры как формат кадра (т.е. число пикселей – элементов изображения на кадр) и электронное увеличение (zoom). Чем больше формат кадра и zoom, тем меньше размеры пикселей и расстояние между ними, т.е. с большей точностью отслеживаются детали изображения.

Максимальный размер пикселей, при котором еще не происходит потери оптического разрешения, определяется критерием Найквиста. Исходя из него, размеры пикселей (и расстояние между ними) должны быть, по крайней мере, в 2.3 раза меньше предела оптической разрешающей способности микроскопа.

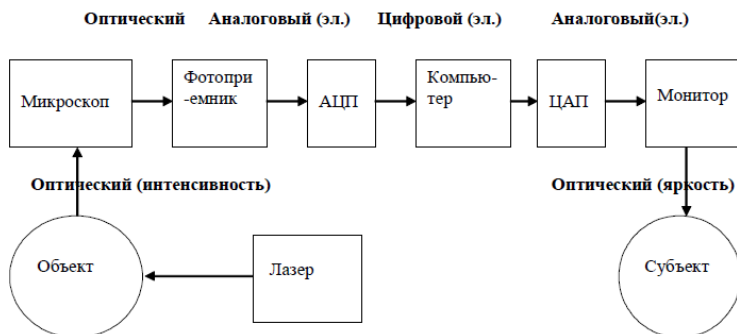


Рисунок 12 - Преобразование сигналов в ЛСКМ

Поэтому для достижения максимально возможного разрешения необходимо стремиться не к максимальному увеличению прибора, а к использованию высокоапертурного объектива. Параметры оптической и сканирующей систем должны соответствовать друг другу.

Еще одно преобразование сигнала - из цифровой формы опять в аналоговую, а затем в оптический сигнал (для вывода изображения на экран монитора). На этом этапе также может происходить потеря информации, в случае несоответствия размера изображения и разрешения монитора: например, в цифровое изображение имеет формат 2048x2048, а монитор 1024x768.

3.10 Конфокальная диафрагма

Диаметр конфокальной диафрагмы (pinhole) имеет существенное значение, поскольку от него напрямую зависит толщина слоя, с которого снимается оптический сигнал. Толщина оптического среза рассчитывается по формуле:

$$T = \sqrt{((0.88 \lambda_n / (n \cdot \sqrt{(n^2 - NA^2)}))^2 + (1.4 n D / NA)^2)}$$

Где: T – толщина оптического среза; λ_n – длина волны света; n – показатель преломления среды; NA – числовая апертура объектива; D – диаметр конфокальной диафрагмы.

Чем меньше диаметр диафрагмы, тем тоньше «оптический срез». Однако при этом уменьшается световой поток, попадающий на фотоприемник.

Оптимальное соотношение разрешение/световой поток достигается в том случае, если диаметр диафрагмы равен диаметру первого дифракционного максимума (диск Эйри).

3.11 Мощность и длина волны и лазера

Длина волны лазерного излучения выбирается исходя из максимума поглощения используемого красителя или структуры, обладающей собственной флуоресценцией, которые подлежат исследованиям на конфокальном микроскопе. Данные о спектрах флуорохромов имеются в справочниках [15], в программном обеспечении микроскопов, или в Интернете (например, <http://www.probes.invitrogen.com>). Необходимо учитывать, что спектр излучения лазерного блока ЛСКМ имеет несколько узких линий. Иногда лучшие результаты (т.е. более интенсивная люминесценция) могут быть получены с более мощной лазерной линией, хотя и расположенной на краю полосы поглощения флуорохрома.

Многие ЛСКМ не имеют в своем составе ультрафиолетового лазера ввиду его дороговизны, громоздкости и сложности в эксплуатации. Такой лазер позволяет возбуждать люминесценцию в синей области спектра (например, красителей типа Hoechst, DAPI). Однако в настоящее время разработан полупроводниковый лазер, излучающий длину волны 405 нм (хотя эта линия находится на краю полосы поглощения указанных красителей и близко к области их флуоресценции). Кроме того, разработаны красители нуклеиновых кислот, заменяющие Hoechst, DAPI и специально рекомендуемые для конфокальной микроскопии в случае отсутствия ультрафиолетового лазера, т.к. их поглощение имеет максимум в области 640-650, а испускание в области 650-670 нм. (ТОТО3, DRAQ5 и др.).

Мощность лазеров регулируется с программной панели с помощью акустооптических фильтров. Необходимо иметь в виду: чем больше мощность лазера, тем быстрее происходит «выцветание» флуорохрома (photobleaching), а кроме того живые объекты могут повреждаться.

3.12 Использование ртутной лампы

В нашем микроскопе отсутствует ультрафиолетовый лазер, который давал бы возможность использовать красители типа DAPI и Hoechst. В ряде микроскопов предусмотрена возможность получения неконфокального изображения с использованием ртутной лампы, и, следовательно, предоставляется возможность наблюдать люминесценцию в синей и зелёных областях. Изображение будет иметь тот же формат и положение, что и конфокальное с использованием лазеров. Поэтому можно получить также наложение изображений разных каналов (оверлей).

Для этого необходимо сначала настроить микроскоп, затем перейти в режим и настроить сканирование при включенной ртутной лампе. Надо сохранить полученное изображение и с помощью операции «сложение» наложить его на конфокальные изображения, полученные с помощью лазерного сканирования.

3.13 Серии срезов

Получение серии оптических «срезов» является одним из основных достоинств конфокальной микроскопии. Имея серию таких срезов можно детально исследовать объемную структуру исследуемого объекта. Число срезов и расстояние между ними выбираются исходя из толщины объекта, аксиальной разрешающей способности прибора, а также из задач, которые ставятся при исследовании. Например, для проведения объемной реконструкции объекта или получения ортогональных проекций число срезов должно быть достаточно большим (30 – 100), чтобы на изображении не проявлялась дискретность структуры. При этом шаг выбирается равным или немного меньшим, чем аксиальная разрешающая способность объектива. Начало и конец серии срезов устанавливаются визуально при перемещении фокуса.

Для выбора наиболее информативного среза или создания эффекта анимации число срезов может быть небольшим (10-20), а шаг превышать разрешающую способность.

Общая толщина серии срезов ограничена как возможностями перемещения z-сканера (порядка 100 мкм) так и рабочим расстоянием объектива. Необходимо также учитывать, что при большой толщине объекта происходит существенное поглощение как возбуждающего, так и испускаемого света, что также ограничивает общую толщину серии срезов. Чтобы этого не происходило надо или снизить концентрацию красителя

или подобрать краситель с другими спектрами возбуждения и испускания.

3.14 Сканирование по длине волны

Этот режим возможен только на некоторых ЛКСМ, у которых фотоприемная часть построена по принципу призматического спектрофотометра, т.е. с плавной регулировкой полосы приема сигнала. В настоящее время такие ЛКСМ выпускают фирмы Leica (TCS SL, SP5, SPE) и Zeiss (LSM 510 Meta). Этот режим сканирования может быть рекомендован в том случае, если точно неизвестен спектр испускания исследуемого флуорохрома. Для этого надо включить режим Mode/xyl (Leica TCS SL), настроить только один приемный канал и установить минимальную ширину спектра фотоприемника (5 мкм). Затем задать область и шаг сканирования. После записи серии изображений можно получить спектр испускания не только со всего кадра, но и с небольшой его области, ограниченной рамкой, что позволяет исследовать спектр испускания отдельных оргanelл и компартментов клеток.

3.15 Временные последовательности

Для исследования динамики можно прописывать серию изображений, снятых в разные моменты времени. Промежутки между кадрами можно задавать в широких пределах, что позволяет изучать также и медленные процессы, например, деление клеток. Из серии можно создавать видео файлы.

3.16 Компьютеры и программное обеспечение

В конфокальном микроскопе компьютер служит для управления всей системой, для получения, обработки и хранения изображений. Зачастую для обработки полученных изображений (например, для деконволюции или объемной реконструкции) требуются большие вычислительные мощности.

Поэтому компьютер должен обладать высоким быстродействием (2-3 ГГц) и большой оперативной памятью (1 Гб и более). Для хранения изображений требуется большая дисковая память. Так для записи серии из 50 «оптических срезов» форматом 1004x1002 элемента в двух спектральных областях потребуется примерно 100 Мб. Для передачи изображений не-

обходим CD/DVDRW или USB-порт. Подключение к локальной или глобальной сети Интернет также является весьма полезным.

Программное обеспечение разделяется на базовое, которое поставляется вместе с конфокальным микроскопом, и служит для управления системой и выполнения основных функций обработки изображения, так и на пакеты прикладных задач, которые могут быть заказаны дополнительно.

Лабораторная работа №1: Настройка конфокального микроскопа

Цель работы: Отработка навыков настройки микроскопа.

Задачи работы:

- Получение навыков работы на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе (ЛСКМ);
- Получение навыков настройки микроскопа;
- Сохранение настроек.

1 Порядок выполнения лабораторной работы

1. Включить питание микроскопа и компьютера.
2. Запустить с рабочего стола ПО.
3. включить питание ртутной лампы кнопкой (рисунок 13) и ручкой усиления

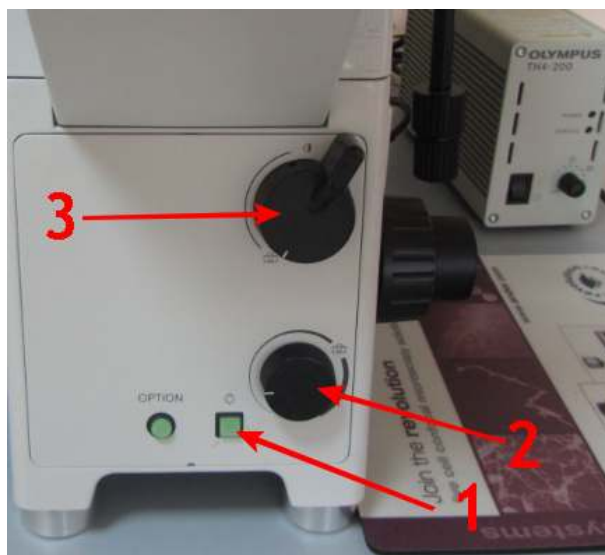


Рисунок 13 – Управление ртутной лампой и режимом микроскопа: 1 – включение ртутной лампы, 2 – регулировка мощности ртутной лампы, 3 – переключатель «окуляры - камера»

4. В программном обеспечении откройте настройки (рисунок 14)

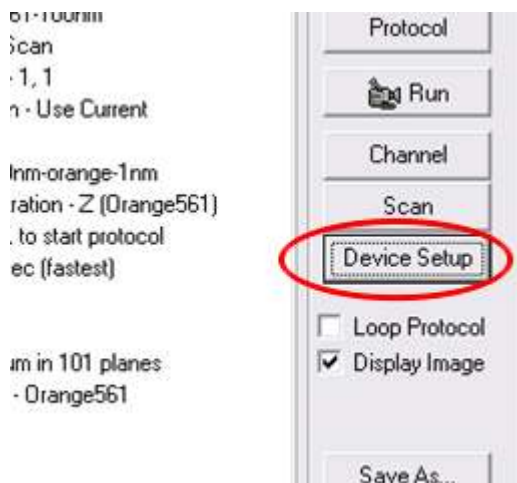


Рисунок 14 – Открытие настроек

5. В появившемся окне на закладке Shutter откройте диафрагму галогеновой лампы (рисунок 15).

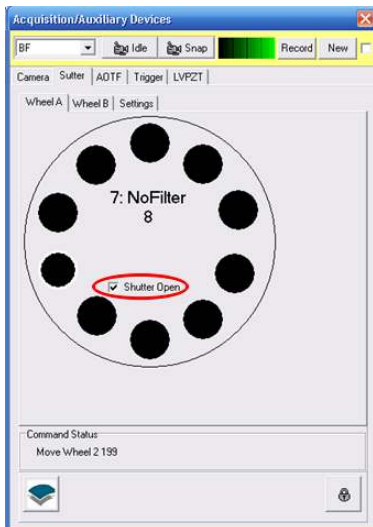


Рисунок 15 – Открытие диафрагмы галогеновой лампы

Должен появиться свет на объекте, падающий сверху.

6. Переключить микроскоп в режим окуляров (рисунок 13).

7. Глядя в окуляры настроить, отрегулировать мощность лампы и настроить резкое изображения объекта, перемещая его в плоскости X-Y и регулируя вертикальное положение фокальной плоскости ручкой z (рисунок 16), которая имеет ручку грубой регулировки и ручку тонкой регулировки. Внимание: объектив может упереться



Рисунок 16 – Ручки позиционирования объекта

8. Закрывать ирисовую диафрагму галогеновой лампы до минимума (рисунок 17)



Рисунок 17 - Ирисовая диафрагма галогеновой лампы



Рисунок 18 – Конденсор: 1- ручка регулировки высоты конденсора, 2 – ручки регулировки позиционирования, 3 - переключатель режима, 4 - объект исследования

9. Глядя в окуляры настроить ручкой конденсора 1 (рисунок 18) настроить резкое изображение диафрагмы (оно также будет минимальным).

10. Ручками регулировки позиционирования конденсора 2 (рисунок 18) отцентрировать положение диафрагмы конденсора в поле изображения.

11. Приоткрыть ирисовую диафрагму. Выполненные настройки необходимы для получения качественного конфокального изображения, в противном случае плоскости фокусировки света и плоскость изображения не совпадают.

12. Зададим программные настройки получения данных. Для удобства работы с настройками предусмотрено их сохранения как настроек канала (рисунок 19): доступен выбор настроек из списка или по кнопке «Channel» переход к редактированию списка настроек.

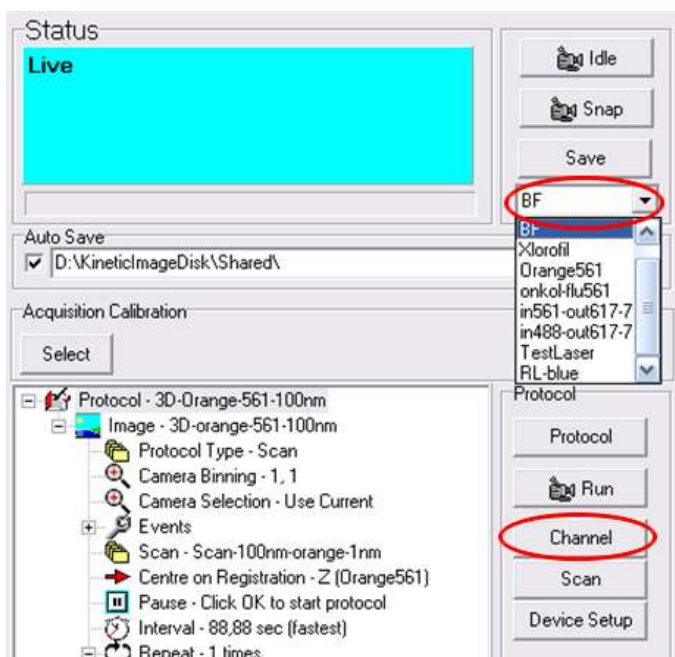


Рисунок 19 – Выбор сохраненных настроек и создание\редактирование настроек

13. Откроем список настроек по кнопке «Channel». Отображается список настроек (рисунок 20). Доступно добавление новых настроек, редактирование, копирование или удаление имеющихся.



Рисунок 20 – Редактирование списка настроек

14. Создадим новую настройку или нажмём редактирование старой. В появившемся окне (рисунок 21) задаётся возможность согласования устройств через блок импульсов согласования. Можно например, сделать, чтобы лазер светил бы не непрерывно, а только на время открытия диафрагмы в камере при записи кадра, что позволяет увеличить время работы с образцом до его выгорания (в данной работе не задействуется).

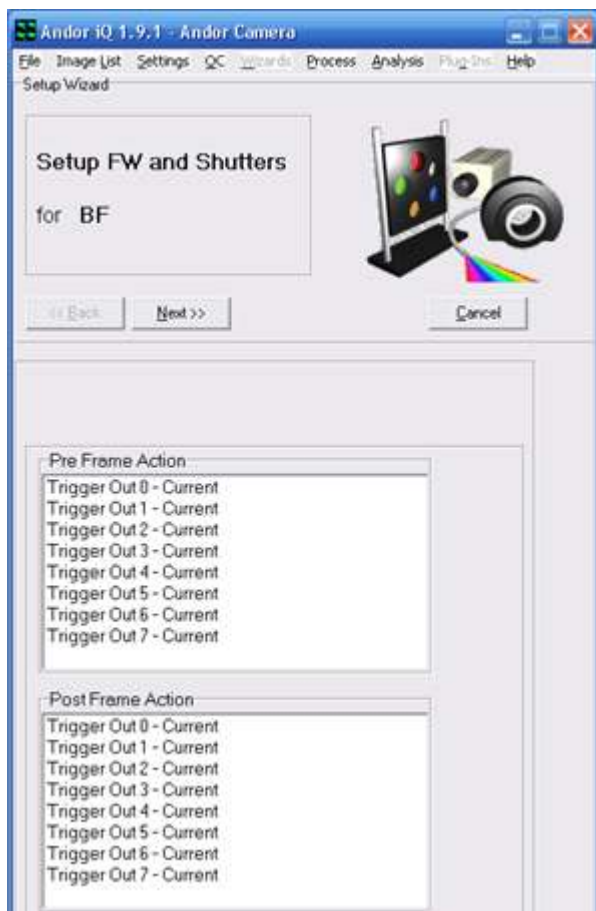


Рисунок 21- Согласование работы блоков в рамках задания настройки канала

15. Нажав кнопку «Next», попадаем в окно настройки колёс фильтров и диафрагм: 1 – выбор колеса, 2 – управление диафрагмой, 3 – выбор фильтра (рисунок 22).

В микроскопе 2 колеса: А – колесо с фильтрами перед камерой, которое используется для выбора фильтров при просмотре флуоресценции (установлено 2 фильтра, спектры которых представлены на рисунке 23), диафрагма же в колесе А стоит перед галогеновой лампой, В – колесо с фильтрами и диафрагмой после ртутной лампы (фильтров на данный момент не установлено).

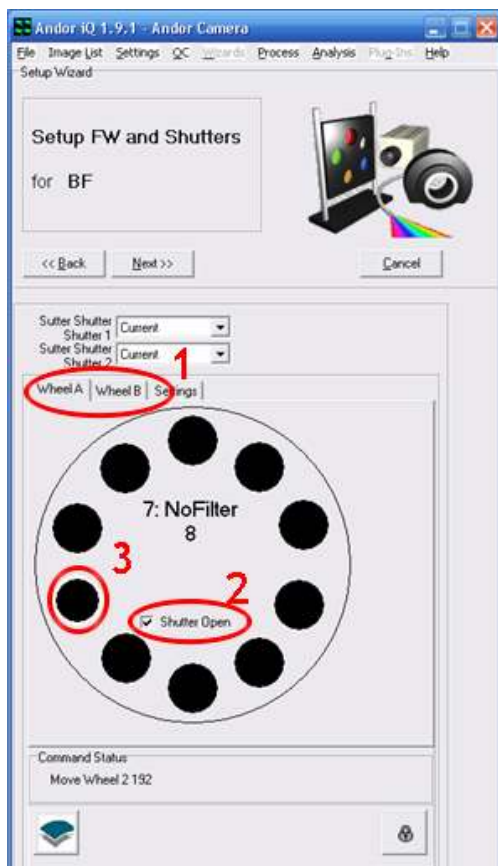


Рисунок 22 - Настройка колёс фильтров и диафрагм: 1 – выбор колеса, 2 – управление диафрагмой, 3 – выбор фильтра

В обоих колёсах положение №8 соответствует пропусканью без фильтра. В колесе А задаём 8 фильтр (без фильтра) и открытую диафрагму. Диафрагма может стоять в прошлом положении, поэтому рекомендуется её переоткрыть.

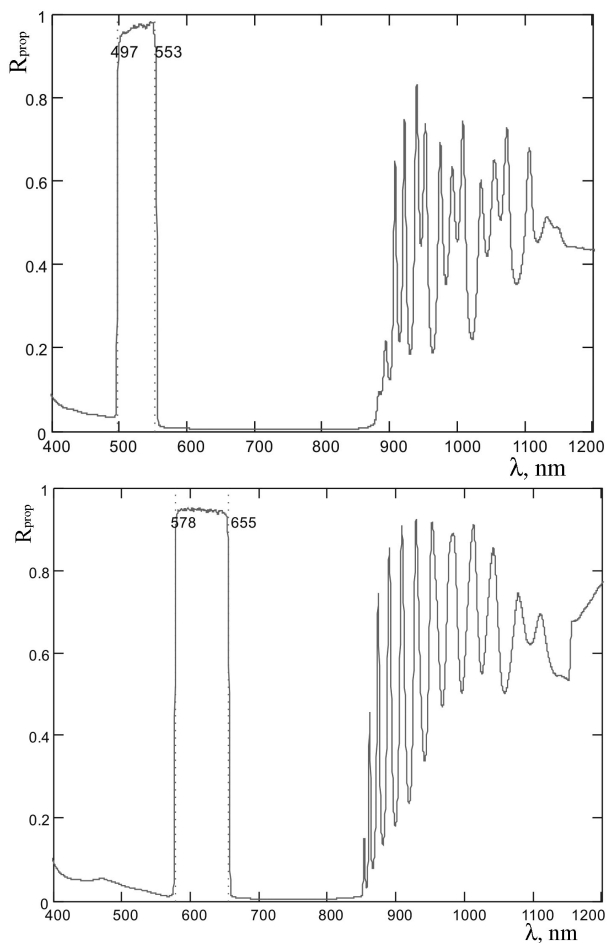


Рисунок 23 – Спектр пропускания флуоресцентного фильтра Fluorescence 525/50 (вверху) и Fluorescence 617/73 (внизу)

16.

16. Нажав кнопку «Next», попадаем в окно задания настроек лазеров: 1 – выбор лазеров, 2 – управление мощностью лазеров, 3 – открытие диафрагмы лазеров (рисунок 24).

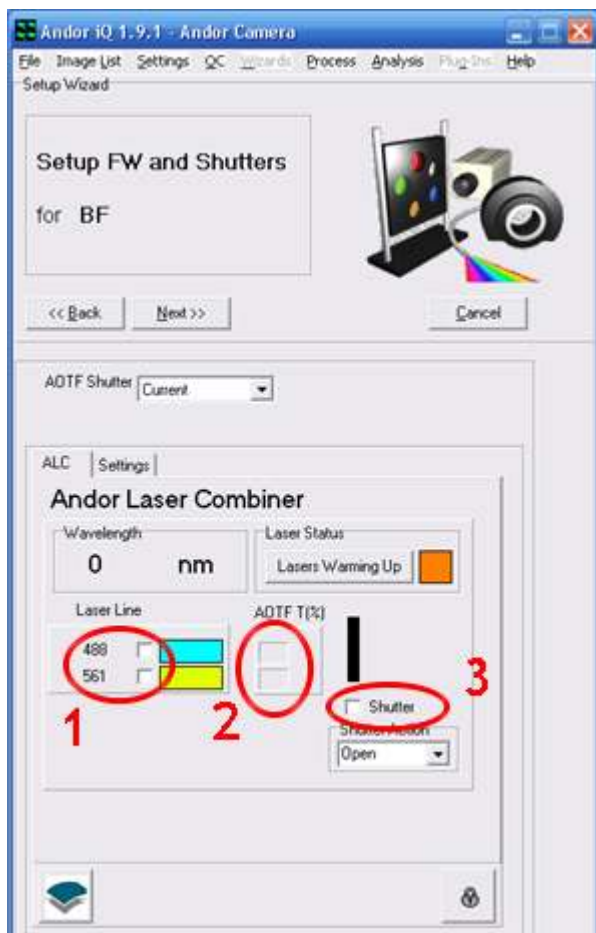


Рисунок 24 – Задание настроек лазеров: 1 – выбор лазеров, 2 – управление мощностью лазеров, 3 – открытие диафрагмы лазеров

Нажав в области 2 задания мощности лазеров, открывается окно задания мощности лазеров (рисунок 25). Мощность задаётся в процентах. Можно одновременно задать 2 лазера. Помимо диафрагмы в блоке лазеров, есть диафрагма в конфокальном блоке, которая включается в целях безопасности вручную.

Лазеры выключаем.

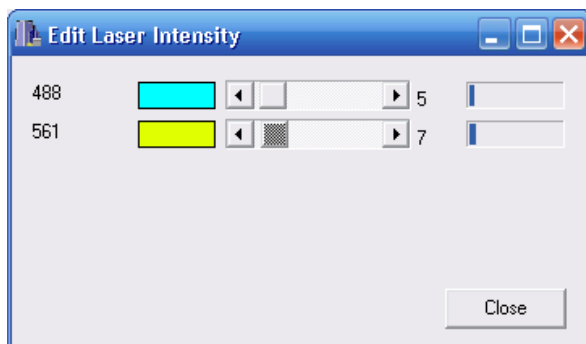


Рисунок 25 – Задание мощности лазеров

17. Нажав кнопку «Next», попадаем в окно задания настроек (рисунок 26) камеры и вывода изображения: 1 – выбор времени экспозиции, 2 – управление электронным усилением, 3 – управление покадровым усреднением, 4 – сложение пикселей, 5 – запуск отображение изображения, 6 – режим отображения изображения

Время экспозиции для минимальное кадра составляет ~ 35 мс. Время экспозиции позволяет увеличить сигнал, что актуально для слабого сигнала, но нужно помнить, что при использовании длительном лазера выгорает область рассматривая в образце.. Также может наблюдаться зашкаливание сигнала в некоторых областях, которое проявляется как белые зоны.

Электронное усиление 2 позволяет в разы и на порядки поднять сигнал, но при этом усиливает и шумы в изображение, поэтому им стоит пользоваться лишь при невозможности решить вопросы другими способами.

Электронное усиление 3 позволяет за счёт усреднения кадров снизить долю шумов, но в разы замедляет скорость получения изображения и данная методика чувствительна к вибрациям, которые приводят к размытию итогового изображения.

Альтернативным вариантом является соединение сигнала от нескольких пикселей, но это уменьшает разрешение мкм\пиксель.



Рисунок 26 – Задание настроек камеры и вывода изображения: 1 – выбор времени экспозиции, 2 – управление электронным усилением, 3 – управление покадровым усреднением, 4 – сложение пикселей, 5 – запуск отображение изображения, 6 – режим отображения изображения

Кнопка «Live» позволяет получить изображение в непрерывном режиме.«Select LUT» позволяет задать цветовое отображение монохроматического изображения с камеры, например в градации зелёной-чёрный.

Задаём время экспозиции 200мс, без усреднения и электронного усиления, в градациях зелёный-чёрный.

2 Контрольные вопросы

1. Зачем в пункте 8 закрывается ирисовая диафрагма?
2. Изображение в окулярах является ли конфокальным?

3. При закручивании ручек регулировки конденсора они его перемещают давлением. Что возвращает линзу конденсора в предыдущее положение при их ослаблении?
4. При работе со слабым сигналом как вы поднимите его?
5. Приведены спектры фильтров, в каком диапазоне должен излучать лазер и светиться флуорофор по графикам?
6. Как думаете, чем объясняется минимальное время экспозиции?
7. Почему при вибрации покадровое усреднение даёт размытие?
8. От чего зависит разрешение в цифровом микроскопе?
9. Определите разрешение микроскопа.
10. В проходящем свете могут наблюдаться потемнения в изображении. Чем они могут быть вызваны?
11. Какой блок на схеме реализует конфокальный принцип?
12. Как лазерное излучение согласуется с ним?

Лабораторная работа №2: Получение и обработка изображений

Цель работы: Отработка навыков получения микроснимков, методом конфокальной микроскопии и их обработка.

Задачи работы:

- Получение навыков работы на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе (ЛСКМ);
- Получение микроизображений объектов исследований;
- Обработка изображений в программном пакете Image: количественный анализ, уменьшение шумов, увеличение контрастности изображений и т.д.

1 Информации по программному обеспечению по обработке полученных изображений

1.1 Общая информация

Для управления ЛСКМ и обработки полученных изображений фирмы-производители поставляют в комплекте базовые программы. Кроме того, имеются различные опции.

Базовый комплект программ после получения изображения в цифровой форме и вывода на экран монитора может обеспечить некоторые функции обработки изображений, такие как:

1. Масштабирование и нанесение различных меток;
2. Изменение яркости, контрастности и цвета;
3. Сложение, вычитание и другие арифметические операции с изображениями;
4. Применение цифровых фильтров для улучшения качества изображений;
5. Построение гистограмм, разрезов по яркости как по всему изображению, так и в выделенных областях (ROI).

Специализированные программы дают и другие возможности, например общедоступная программа Image позволяет проводить количественный анализ.

1.2 Общая информация о программе ImageJ

ImageJ — это программа с открытым исходным кодом для анализа и обработки изображений. ImageJ позволяет отображать, редактировать, анализировать, обрабатывать, сохранять и печатать 8-, 16- и 32-битные изображения. Программа может читать многие форматы изображений, такие как TIFF, PNG, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS, а также raw форматы.

Интерфейс программы ImageJ:

- Команды меню Plugins

В настоящее время для программы ImageJ написано более 500 плагинов и более 300 макросов, и их количество постоянно увеличивается. Отдельно загружаемые плагины и макросы существенно расширяют возможности ImageJ. Этот раздел меню ImageJ посвящен работе с плагинами и макросами.

- Команды меню File

Данное меню содержит основные команды для работы с файлами. Здесь можно создавать новые изображения или стеки, открывать и редактировать имеющиеся, сохранять различные изменения файлов, конвертировать изображения в разные форматы, импортировать файлы разных форматов в ImageJ для дальнейшей работы с ними.

- Команды меню Image

Раздел меню ImageJ, в котором содержатся команды для работы с изображением - исправление типом изображения, цветом, команды для работы со стеками и гиперстеками, для создания дубликатов, для увеличения/уменьшения изображения и т.д.

- Команды меню Edit

Edit – Редактирование. Данное меню позволяет делать стандартные манипуляции вставки и удаления, также имеет массу дополнительных возможностей. Здесь следует сделать акцент на возможности редактирования активного изображения, поскольку редактирование в текстовых окнах полностью аналогично редактированию, например в «блокноте» Windows.

- Команды меню Analyze

В данном меню ImageJ находятся команды для разнообразного анализа изображения или его частей, команды выбора параметров анализа, для работы с гистограммой изображения, а также дополнительные инструменты для анализа.

- Команды меню Process

В этом разделе меню содержатся команды, позволяющие проводить различные операции над изображениями или выделениями.

- Остальное

Раздел, в котором собрана дополнительная информация об интерфейсе программы ImageJ - меню Help, меню Windows, горячих клавишах, панели инструментов и т.д.

1.3 Уменьшение шумов и увеличение контрастности изображений

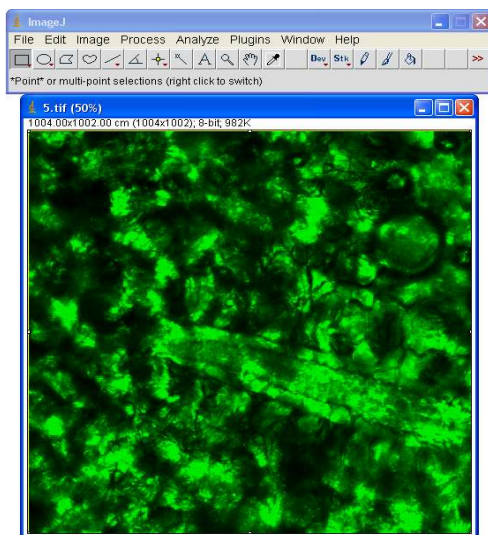


Рисунок 27 – Внешний вид программы

- Выделяем всю область изображения «Edit→Selection→Select All» (рисунок 28)

- После выполнения п.1-2 получаем изображение для обработки (рисунок 27).

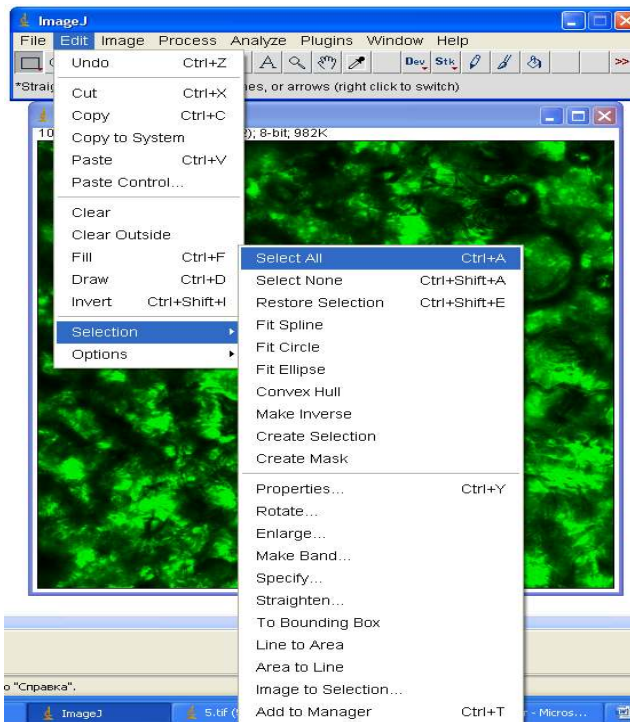


Рисунок 28 – Задание области обработки

- Убираем шумы на изображения с помощью «Process→Noise→Despeckle»(рисунок 29)

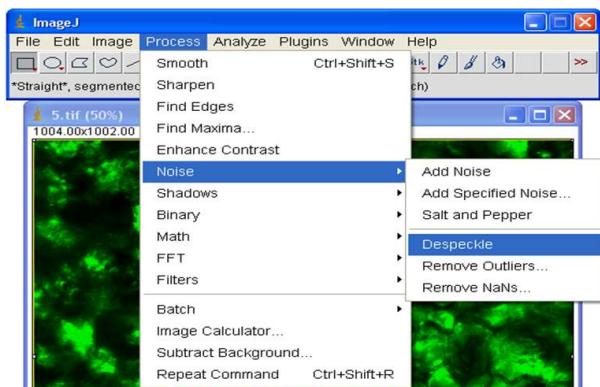


Рисунок 29 – Устранение шумов

- Применяем фильтр «Process→Filtres→Maximum» Этот фильтр, заменяющий все пикселя в окрестности на пиксель, который имеет наибольшее значение в данной окрестности (рисунок 30).

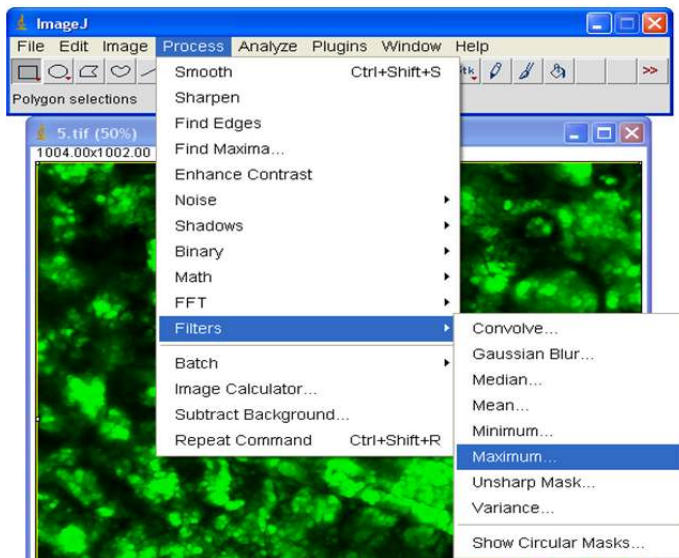


Рисунок 30 – Обработка изображения фильтрами

- С помощью команд « Image→Adjust→Brightness/Contrast» (рисунок 31) изменяем контраст и яркость изображения. В результате получаем более насыщенное изображение.

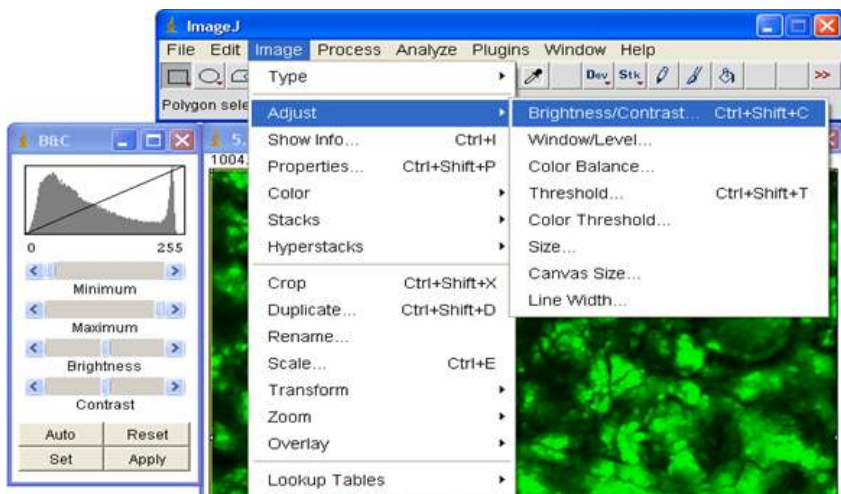


Рисунок 31 – Задание контрастности

- С помощью команд «ImageJ→ Adjust →Color Balance» (рисунок 32) изменяем цветовой баланс (в данном случае зеленый и желтый цвета).

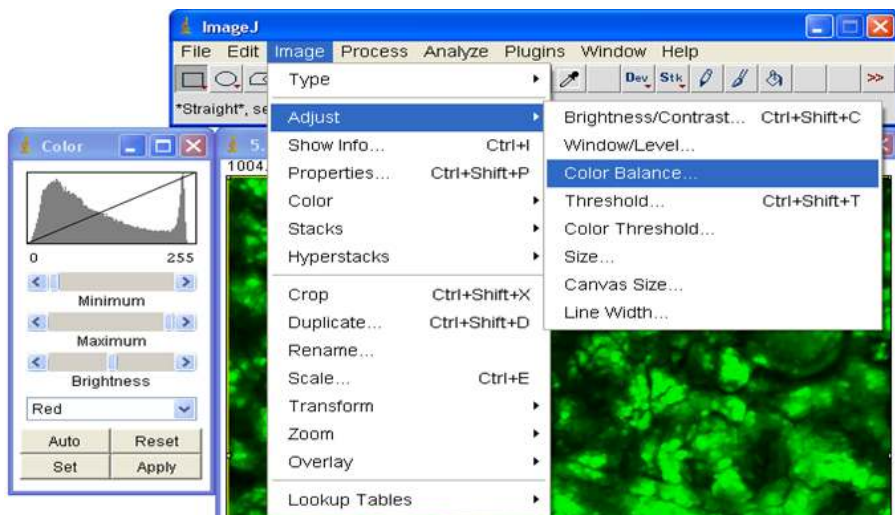


Рисунок 32 – Задание цветового баланса

- Получаем изображение лучшего качества. (рисунок 33)

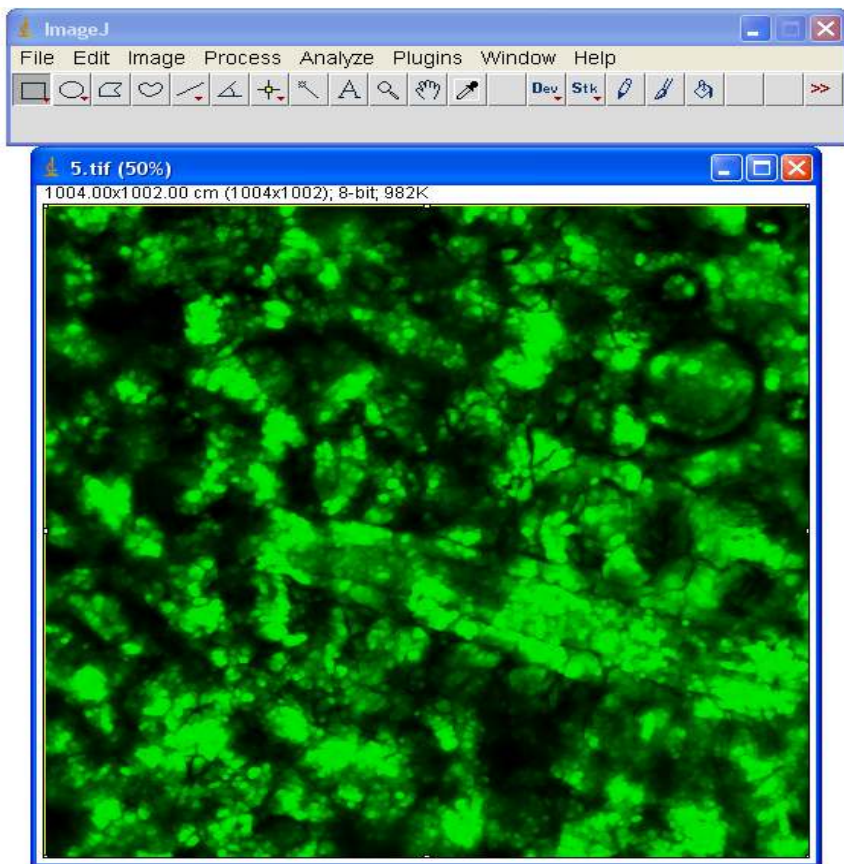


Рисунок 33 – Итоговое изображение

2 Порядок выполнения лабораторной работы

1. Включить и осуществить настройку конфокального микроскопа (см. лабораторную работу №1).
2. Выбрать одну из настроек канала 3 (рисунок 34).
3. Получить микроснимок изображения объектов исследований каждому студенту:

Нажатие кнопки «Live» 2 дает изображение с камеры в постоянном режиме. При этом появляется кнопка «Snap» 2, нажатие на которую сохраняет в хранилище изображение (рисунок 34). «Live» снова активизирует камеру, так можно записать множество снимков в хранилище.

С помощью панели 1 можно выделять области, задать линейки на изображении, померить размеры, добавить таймер или текст.

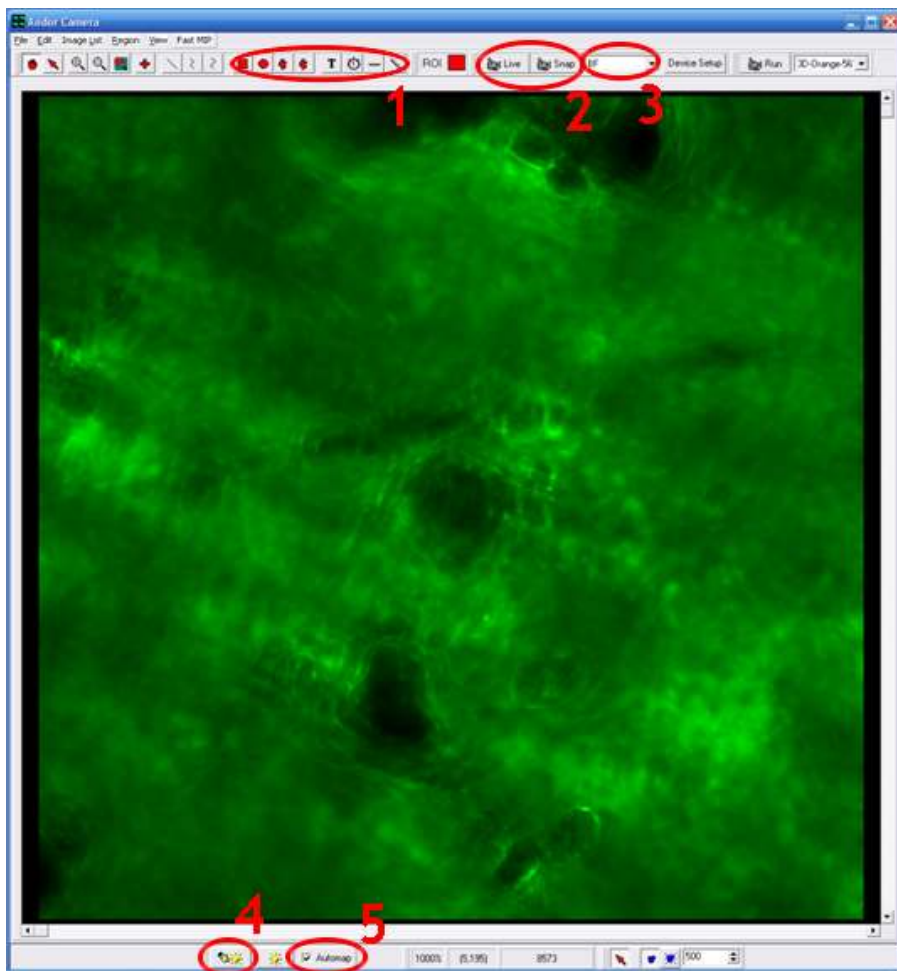


Рисунок 34 – Окно отображения изображения: 1 – Выделение областей, 2 – кнопки запуска\записи изображения, 3 – выбор настроек канала, 4 – настройка контраста снимков, 5 - автоконтраст

Кнопка настройки контраста 4 открывает соответствующее окно (рисунок 35), где выводится гистограмма интенсивностей точек изображения. А вертикальны зелёный и синий отрезки, задать минимум интенсив-

ности и максимум. Что было меньше минимального уровня система примет за ноль, а что выше максимума, поставит максимумом.

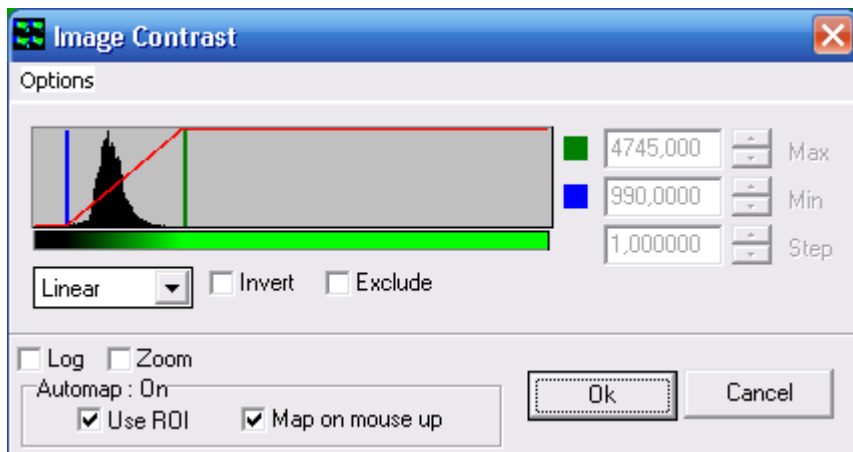


Рисунок 35 – Настройка контраста снимков

В данном окне (рисунок 35) также можно заменить функцию восприятия интенсивности, например линейную на экспоненциальную, что для сильно поглощающих образцов может быть полезным. На рисунке 34 также имеется кнопка включения автоконтраста, которая позволяет в автоматическом режиме системе подбирать оптимальный контраст, однако в случае получения численных данных из снимков это может исказить информацию.

Хранилище открывается через меню Image List (рисунок 36), там удобно выбрать через режим групп.

В нижней части выводится список файлов с датами их создания и размерами. В верхней части приводится описание характеристик системы, использованных при получении данных.

Для сохранения выделяют снимки с серией и записывают их через «Save Image» в формате «Tiff» (рисунок 37).

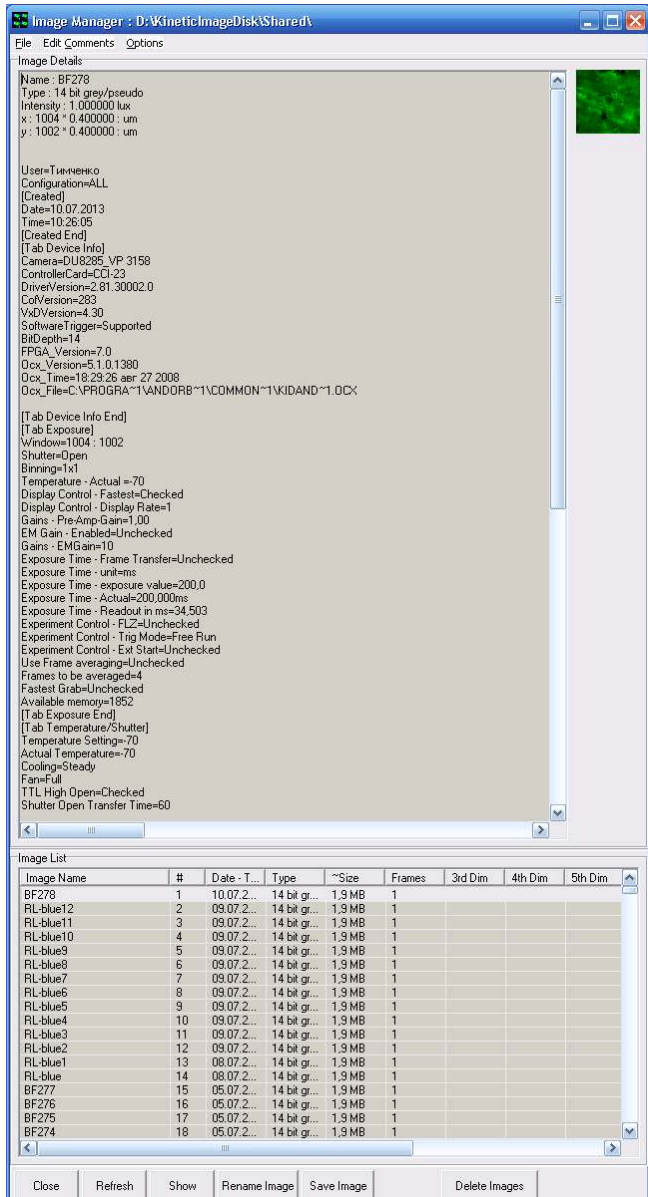


Рисунок 36 – хранилище данных

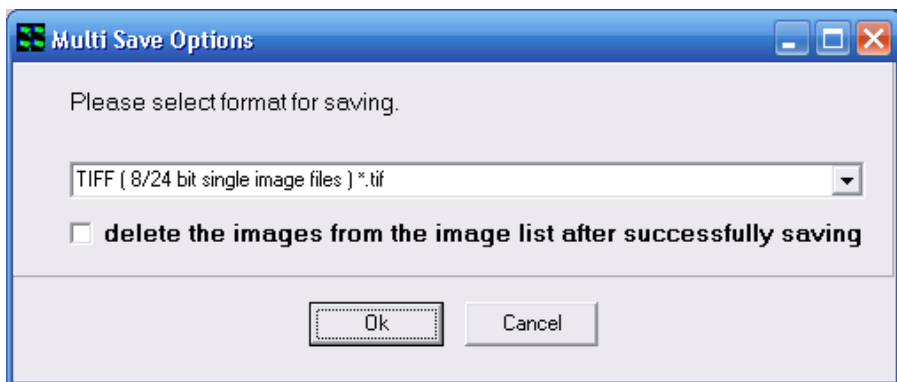


Рисунок 37 - сохранение группы файлов

На Andor изображения сохраняются на жестком диске компьютера в отдельной папке, в которой находятся два служебных файла и как минимум одно изображение в формате tif. В служебном файле в текстовом формате записаны данные о параметрах ЛКСМ, которые можно просмотреть. Tiff формат предпочтительнее тем, что многие форматы 14битное изображение конвертируют в 8ми битное, являющееся стандартным для них. И хоть визульно глаз это и не замечает, но при оцифровки изображения потеря информативности заметна.

Серия изображений записывается также в одну папку. Поэтому для просмотра изображений на другом компьютере можно воспользоваться любой стандартной программой просмотра изображений.

После трансформации изображений их можно обрабатывать также другими программами, например, ACDSsee, Photoshop. Но для обработки конфокальных изображений наиболее удобна программа ImageJ, разработанная и свободно распространяемая National Institutes of Health, USA (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

3. Обработать полученное изображение с помощью специализированного пакета Image, согласно предоставленному варианту задания преподавателем.

3 Контрольные вопросы:

1. Почему выбран формат Tiff для сохранения изображения.
2. Какая функция представляется в виде изображения, в чём измеряется она и её параметры?

3. В каком диапазоне лежат значения функции в изображении и её параметров?
4. Если уменьшить ширину пикселя в 2 раза при сохранении размеров матрицы, что произойдёт с изображением?
5. Если поставить объектив с в 2 раза большим увеличением. Что произойдёт с изображением?
6. На рисунке 35 что отложено по осям?
7. На рисунке 35 гистограмма расположилась слева. Как было бы лучше, если она располагалась справа, по центру, была бы шире или уже? Почему
8. Как выглядело бы зашкаливание сигнала?
9. При преобразовании 14 битного изображения в 8 битное в 8битном изображении точке со значением 111 какой диапазон интенсивностей соответствует в 14 битном изображении.
10. При форматировании изображения через контраст, что со значениями интенсивности в точках происходит?
11. Как думаете, работает фильтр усредняющий? Чем отличается работа фильтра по максимуму (рисунок 30)?
12. Если текущую «окрестность» работы фильтра увеличить, что это даст? Что произойдёт с изображением?

Лабораторная работа №3: Определение концентрации хлоропластов в листьях растений

Цель работы: оценка количественной характеристики хлоропластов в растениях, находящихся в условиях внешнего воздействия с помощью метода конфокальной микроскопии

Задачи работы:

Получение микроизображений растительной ткани, находящихся в различных условиях внешнего воздействия.

Количественный анализ с помощью программы Image.

Построение гистограммы количественных показателей растений в программной среде Excel.

1 Теоретические основы

Увеличение объемов активной добычи полезных ископаемых и химического производства привело к накоплению в гидросфере синтетических поверхностно-активных веществ (СПАВ) [16], которые оказывают существенное влияние на функционирование живых систем гидросферы [17]. Данные воздействия приводят к изменению количественно и качественного состава растительной ткани, изменению содержания основных пигментов. Последнее в свою очередь отражается на изменении оптических характеристик растительной ткани и, прежде всего, на спектральных свойствах растений.

Для понимания механизмов накопления и воздействия поллютантов на живые системы крайне важным является анализ изменений в структуре растения на клеточном уровне. Учитывая высокую эффективность флуоресценции хлорофилла, в настоящей работе для микроскопического анализа использован метод конфокальной флуоресцентной микроскопии [18], обеспечивающий контрастные микроснимки высокого разрешения.

2 Порядок выполнения лабораторной работы

Варианты лабораторной работы

№	Объект исследований	Внешнее воздействие
1	Элодея бразильская	контроль
2		СПАВ 0,02%

3		СПАВ 0,2%
4		СПАВ 2%

1. Включить и осуществить настройку конфокального микроскопа (см. лабораторную работу №1).

2. Получить микроизображение с объекта исследований (см. лабораторные работы №1-2). В видимом свете от галогеновой лампы (BF канал) и режиме естественной флуоресценции, возбуждаемой лазером (Xlogofill режим). При включении второго режима не забудьте открыть кнопкой на конфокальном блоке диафрагму. На лазерное излучение пристально не смотреть!!!!

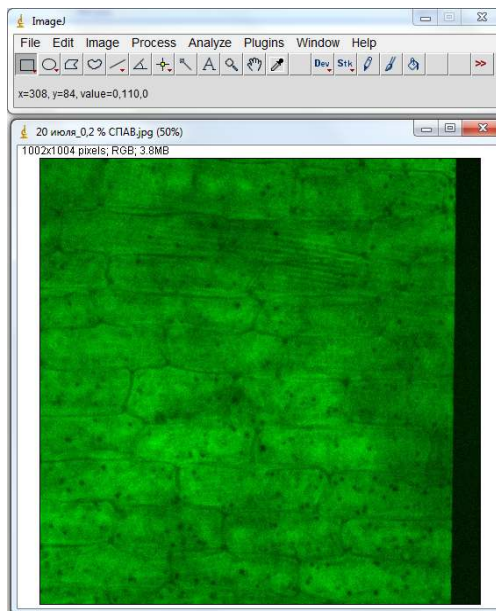


Рисунок 38 - Микроснимок элодеи бразильской, полученный с помощью конфокального микроскопа

Микроснимок элодеи бразильской, полученный с помощью конфокального микроскопа (рисунок 38) в видимом свете от галогеновой лампы

3. Обработать изображения в ImageJ.

Применение в комплексе ImageJ команды «Edit→Selection→Select All» (рисунок 39), позволяет нам выбрать всю область изображения. При дальнейшей работе, все выполняемые функции будут применяться ко всему изображению.

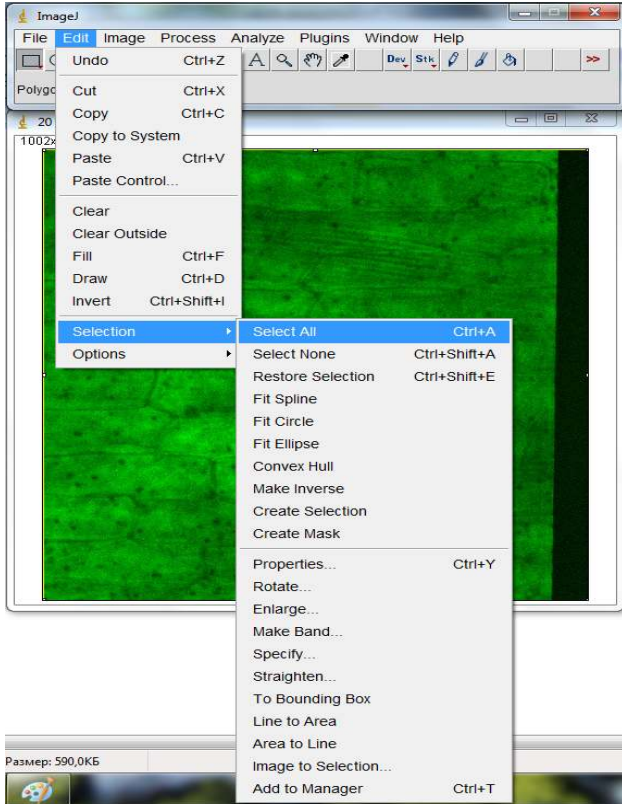


Рисунок 39 – Задание области обработки

- С помощью команды «Process→Noise→Despeckle» (рисунок 40), можно убрать шумы, присутствующие на изображении.

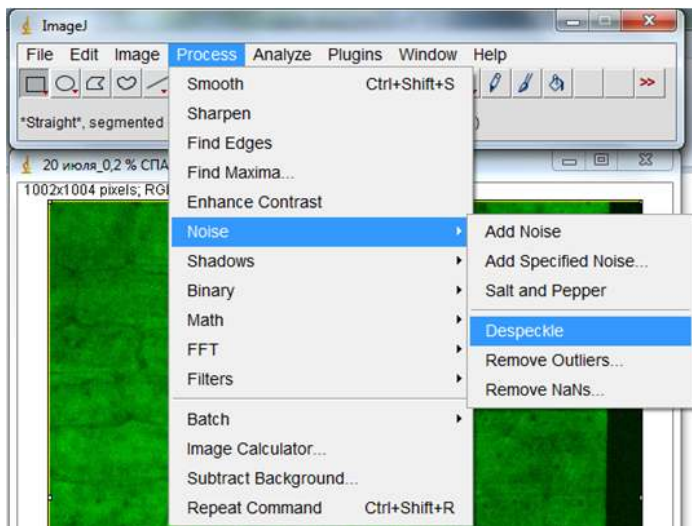


Рисунок 40 – Устранение шумов

-С помощью команд «Image→Adjust→Brightness/Contrast» (рисунок 41) изменяем контраст и яркость изображения.

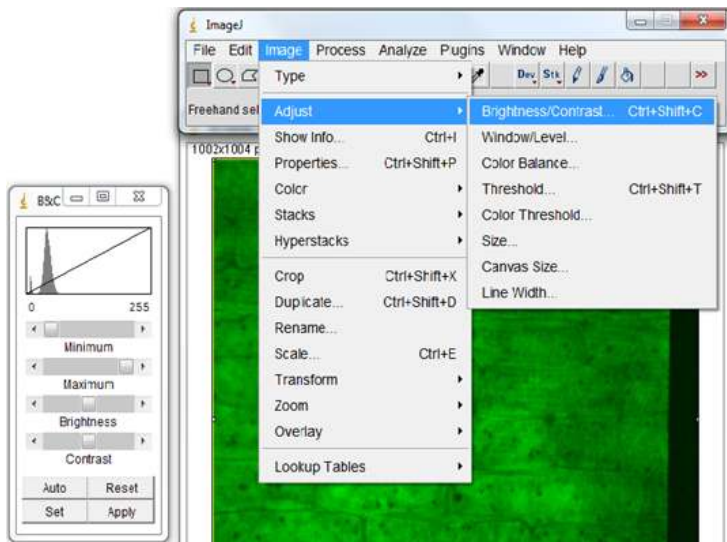


Рисунок 41 – Обработка изображения изменением контраста

- В результате получаем изображение, улучшенного качества (рисунок 42).

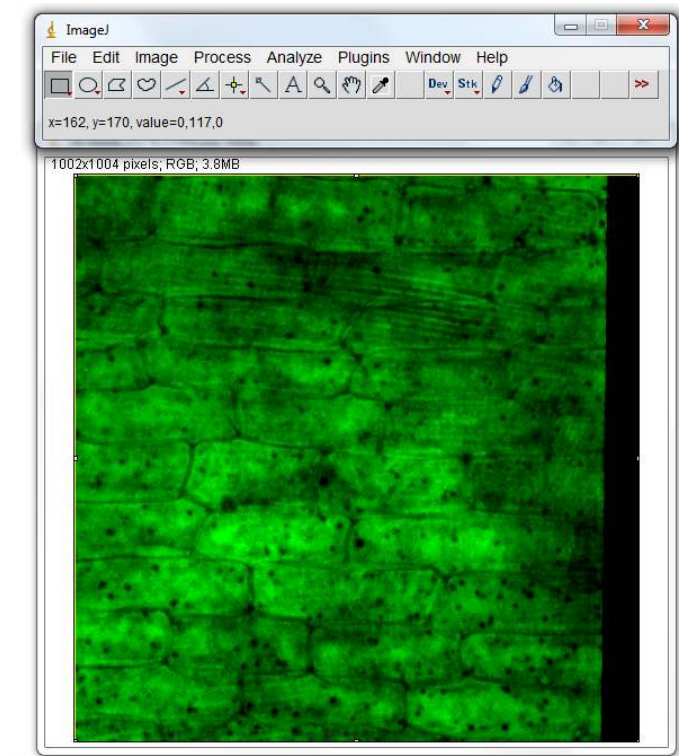


Рисунок 42 – Изображение после обработки

4. Аналогичную обработку проводим по остальным изображениям для других образцов и второго канала.

5. По полученным обработанным изображениям канала «Xlorofill» подсчитать среднее количество хлоропластов в 10-х blastах растения для проходящего света от галогеновой лампы канал «BF» и естественной флуоресценции хлорофилла, возбуждаемой лазером канал «Xlorofill» (рисунок 43).

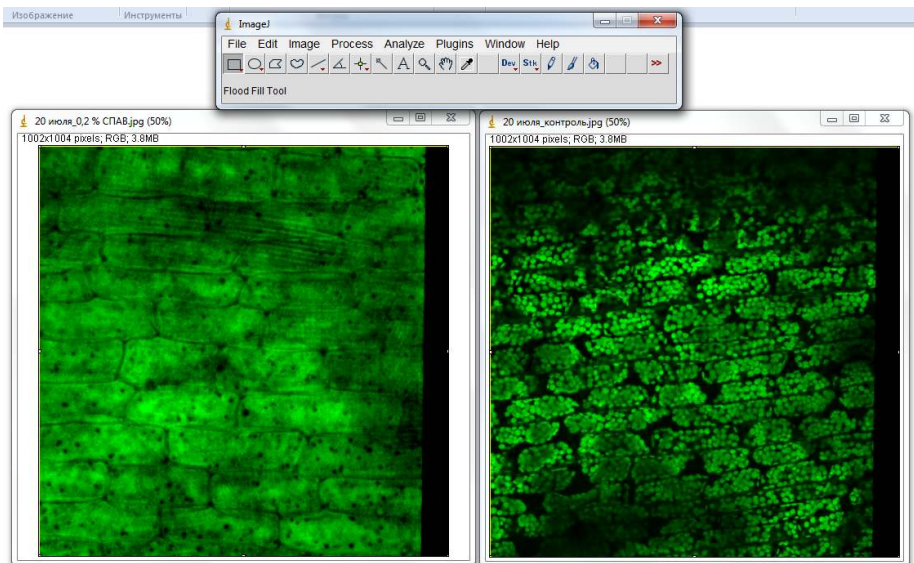


Рисунок 43 – Изображение после обработки для проходящего света от галогеновой лампы канал «BF» (слева) и естественной флуоресценции хлорофилла, возбуждаемой лазером канал «Xlorofill» (справа)

6. Забить данные в виде таблицы в программном пакете Excel.

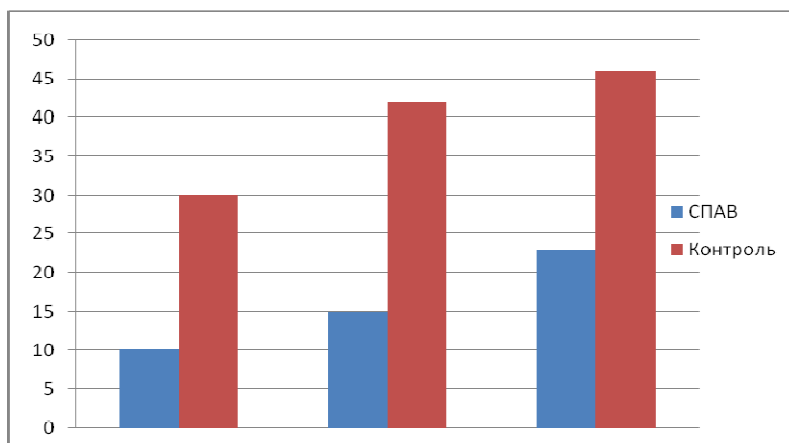


Рисунок 44 – Гистограмма зависимости концентрации хлоропластов в зависимости от концентрации СПАВ

7. В программном пакете Excel построить гистограмму вида (рисунок 44), но с подписями данных и значений.

3 Контрольные вопросы

1. Часть изображения может быть не в фокусе. Чем это может быть вызвано?
2. Почему изображения для проходящего света и флуоресценции показывают разные объекты?
3. Сравните изображения на рисунках 38 и 42. Поясните, что изменилось?
4. К чему приводит присутствие СПАВ в питательной среде?
5. Если в объекте отсутствуют естественные флуорофоры, что необходимо сделать?
6. Могут ли эти действия сказаться на объекте?
7. Если в объекте 2 флуорофора, то можно ли при помощи монохроматической камеры получить их независимые изображения?
8. Если долго снимать флуоресцентное изображение, к чему это приведёт?
9. Для данных опытов не заметили, через сколько времени начинаются изменения?
10. Сравните настройки каналов «BF» и «Xlorofill». Поясните различия.
11. Флуоресценция будет наблюдаться от обоих лазеров, но она не видна при обычном свете. Почему?
12. Фактически считается не объёмная концентрация, а концентрация в фокальной плоскости (концентрация на единицу площади). Как думаете, в данном случае допустимо ли подобное упрощение?

Лабораторная работа №4: Получение 3D реконструкции объекта и динамических серий

Цель работы: Получение 3D реконструкции объекта и динамических серий.

Задачи работы:

- освоить принципы задание настроек получения серий,
- Получение 3D реконструкции объекта,
- Получение динамических серий.

1 Теоретические основы

Лазерный флуоресцентный конфокальный микроскоп в отличие от обычного позволяет работать с «толстыми образцами», а значит нет необходимости их фиксировать и резать, кроме того, учитывая селективность возбуждения красящих флуорофоров, есть возможность их одновременного введения и разделения за счёт селекции возбуждения в изображении.

Учитывая вышесказанное лазерная сканирующая конфокальная микроскопия позволяет воспользоваться помимо пространственных измерений X и Y следующими измерениями:

1. Время t (в обычной микроскопии можно тоже прописать динамические процессы, но в основном только для клеток в чашках Петри, т.к. фиксация и разрезание на слои «убивает» образец). Здесь же появляется возможность видеть более широкий спектр динамических процессов.

2. Координата z . Это даёт возможность прописать серию изображений по глубине, так и построить из неё 3D - реконструкцию объекта.

3. Длина волны λ . Селективное возбуждение флуорофоров и селективное испускание позволяет, имея даже монохроматическую камеру, разделять их. При использовании 2х флуорофоров принципиально имеются 4 спектральных диапазона: для каждого флуорофора диапазон возбуждения (диапазон длин волн, на которых происходит поглощение с последующей люминисценцией) и диапазон испускания. Флуорофоры можно в изображение разделить или по возбуждению или по излучению.

В случае если диапазоны возбуждения не пересекаются или пересечение неполное (существуют области независимые для каждого флуорофора), необходимо лазерные источники подбирать так, чтобы они излучали,

возбуждая только один флуорофор, так чтобы не попадали при этом в диапазон возбуждения второго. В этом случае камера последовательно регистрирует изображения флуоресценции первого флуорофора, возбуждённого первым лазером и потом после выключения первого лазера второго флуорофора.

Во втором же случае диапазоны испускания не пересекаются или пересечение неполное. Подбираются узкополосные фильтры таким образом, чтобы отсечь изображения второго флуорофора, оставляя первого.

Кроме того необходимо помнить, что люминисценция на несколько порядков слабее рассеяния. Поэтому фильтры хорошо подавлять и рассеяние на основной длине волны лазера, в противном случае мы получим рассеянное изображение.

Запись данных с использованием этих измерений задаётся в программном обеспечении как серии. Рассмотрим работу с ними.

2 Порядок выполнения лабораторной работы

1. Включить и осуществить настройку конфокального микроскопа (см. лабораторную работу №1).

2. Работа с сериями ведётся через кнопку 1 (рисунок 45) – редактирование списка серий, кнопку 2 – запуск измерения серии и описание кнопку 3 – настройка сканеров, описание 4 – параметры выбранной серии.

3. Зайдём в редактирование списка протоколов (рисунок 46).

Доступно добавление новых настроек, копирование или удаление имеющихся.

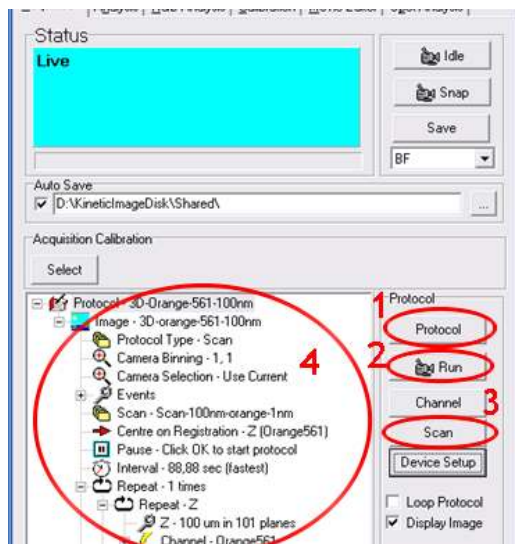


Рисунок 45 – Работа с сериями: 1 – редактирование списка серий, 2 – запуск измерения серии, 3 – настройка сканеров, 4 – параметры выбранной серии



Рисунок 46- Редактирование списка протоколов

4. Создадим новую настройку В появившемся окне (рисунок 47) задаются настройки протокола.

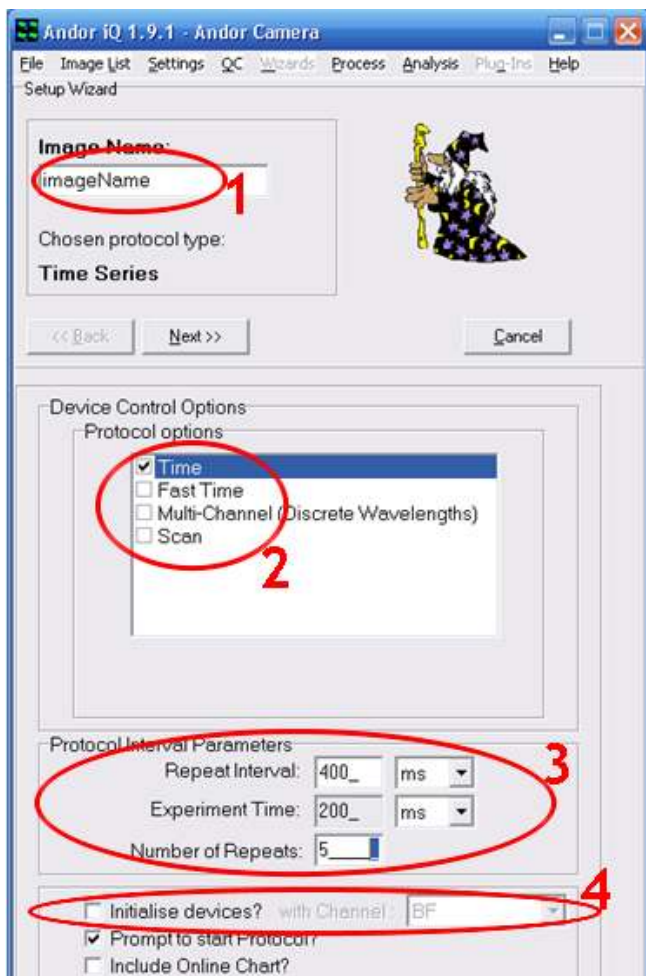


Рисунок 47 – Окно настройки протокола: 1 – задание имени протокола, 2 – выбор типа протокола, 3 – настройка параметров типа протокола, 4 – ассоциирование протокола с настройками канала

Вверху задаётся имя протокола. Переключатели 2 позволяют задействовать следующие типы протокола:

- запись динамики процесса,
- запись быстропротекающего процесса,
- мультиканальное снятие изображения,
- сканирование по оси z.

В области 3 задаются настройки выбранного типа протокола. Так для протокола от времени задаются время итого эксперимента, время повтора, число снимков в серии.

Переключатель 4 позволяет ассоциировать протокол с каналом, а значит настройки оборудования канала микроскопа (см. Лабораторную работу №1) будут применены.

5. Нажатие кнопки «Next» приводит к окну выбора канала в настройках протокола (рисунок 48).

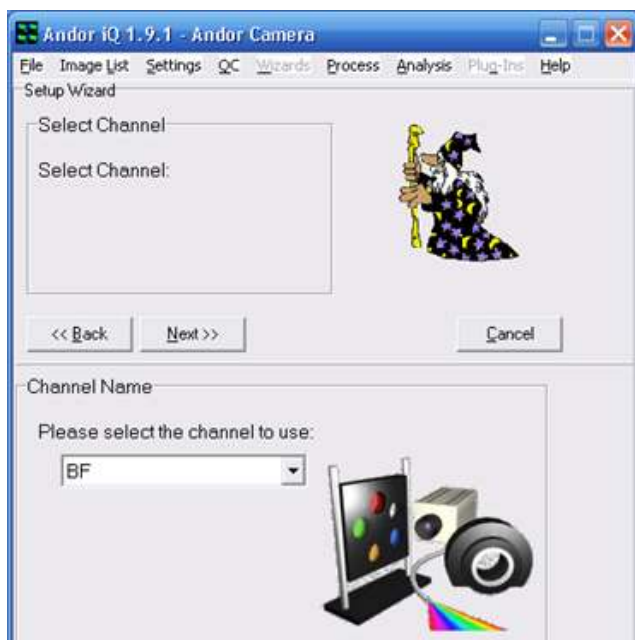


Рисунок 48 – Окно выбора канала в настройках протокола

6. После выбора канала и нажатия кнопки «Next» попадаем в окно (рисунок 49), где отображаются некоторые из настроек канала.

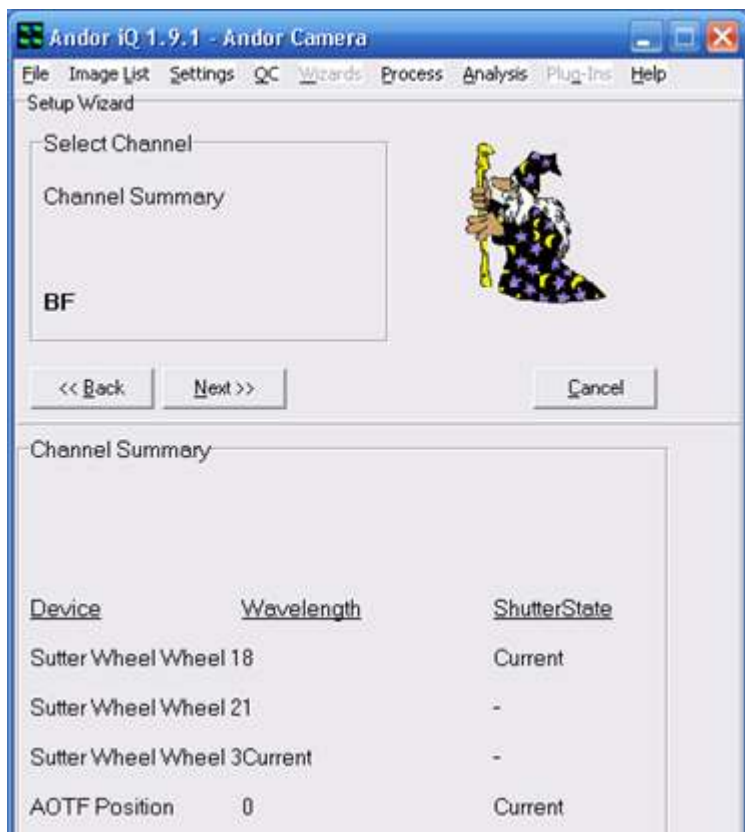


Рисунок 49 – Настройки диафрагм протокола

На этом настройка временного протокола завершается.

7. Для протокола z-сканирования должны быть заданы настройки сканера, список которых открывается для редактирования при нажатие кнопки 3 (рисунок 45).

При этом открывается окно со списком настроек сканеров (рисунок 50): 1 – выбор варианта задания настроек, 2 – задание настроек, 3 – управление текущим положением z-сканатора

Так если выбрать тип как задания «числа слоёв», то необходимо ввести координаты начальной и конечной плоскости сканирования и число слоёв.

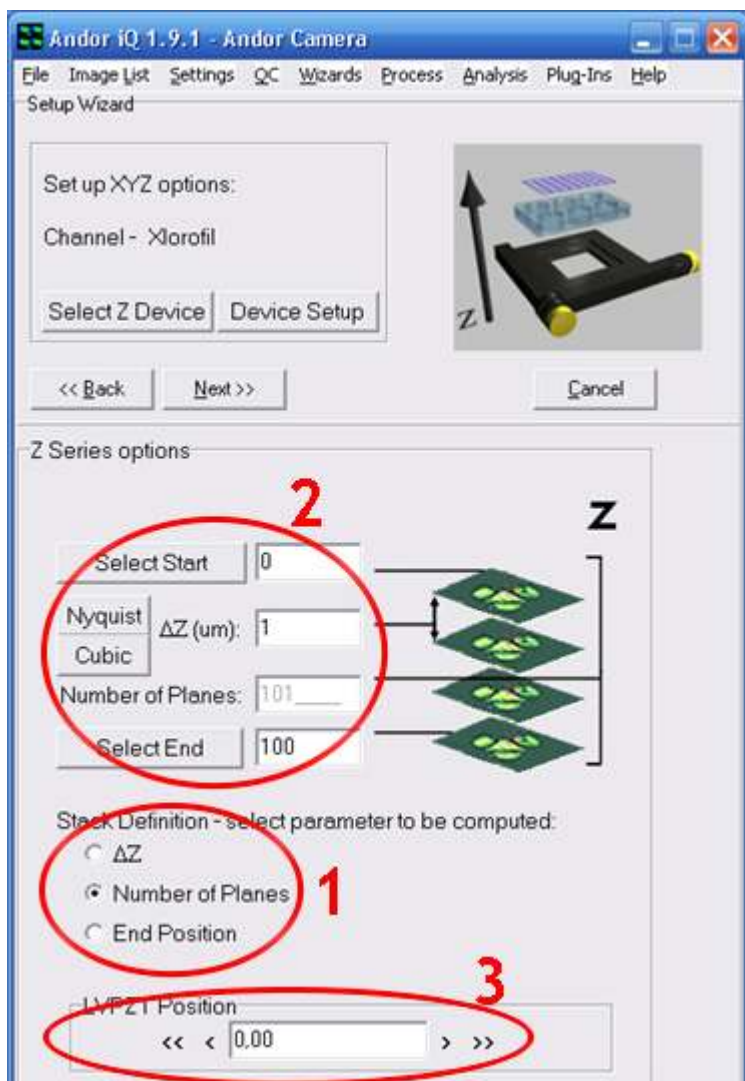


Рисунок 50 – Окно со списком настроек z-сканера: 1 – выбор варианта задания настроек, 2 – задание настроек, 3 – управление текущим положением z-сканатора

8. Проверьте и задайте 2 протокола: протокол временной «Laba-time» (канал «BF» интервал повторения 500 мс, время эксперимента 200 мс, число повторений 200), протокол z-сканирования (канал «Xlorofil», координаты плоскостей, исходя из толщины образца).

9. Запустите протоколы для измерения (рисунок 45).
10. Сохраните данные временного измерения из хранилища (рисунок 36) в формате видео-файла.
11. Загрузите изображения z-серии из хранилища и попробуйте построить 3D-реконструкцию объекта. Совместно с преподавателем.

3 Контрольные вопросы

1. Можно ли комбинировать серии? Например, по времени и z-координате?
2. С какими негативными явлениями можно столкнуться при снятии флуоресценции?
3. Как с ними бороться?
4. Что ограничивает толщину слоя при 3D визуализации?
5. К чему приведёт большой шаг при сканировании при координате?
6. Можно ли определить скорость движения частиц (например, в жилке растения)?
7. Если можно, то, как это сделать?
8. Можно ли подобные серийные исследования проводить на обычном микроскопе?
9. Почему z-сканер имеет диапазон перемещения всего 100мкм?
10. Если в объекте 2 флуорофора, то, как получить независимые изображения от каждого из них?
11. К чему приведут вибрации при записи временной серии?
12. К чему приведут вибрации при записи z-серии серии?

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Robert, H. Webb Confocal optical microscopy / H. Webb Robert // Rep. Prog. Phys. – 1996. - №59. – P.427-471.
2. Richards B. Electromagnetic diffraction in optical systems II. Structure of the image field in an aplanatic system / B. Richards, E. Wolf // Proc. R. Soc. A. - 1959. – №253. - P.358-379.
3. Kino, G. S. Confocal scanning optical microscopy / G. S. Kino, T. R. Corle // Phys. Today. - 1989. - №42. - 55–62.
4. Pawley, J.B. Fundamental and practical limits in confocal light microscopy / J.B. Pawley // Scanning, – 1991. - №13. – P.184–198.
5. Shotton D. Electronic Light Microscopy / D. Shotton (ed) // Techniques in Modern Biomedical Microscopy (Wiley-Liss). – 1993. – 351p.
6. Slater, E. M. Light and Electron Microscopy / E. M. Slater, H. S. Slater. Cambridge: Cambridge University Press, - 1993.
7. Stevens, J.K. Three-Dimensional Confocal Microscopy / J.K. Stevens, L.R. Mills, J. Trogadis (eds). San Diego, CA: Academic. – 1993.
8. Webb, R. H. Confocal microscopes / R. H. Webb // Opt. Photon. News. – 1991. - №2. – P.8–13.
9. Wilson, T. Scanning optical microscopy / T. Wilson // Scanning. – 1985. - №7. – P.79–87.
10. Wilson, T. (ed) Confocal Microscopy / T. Wilson (ed). - London: Academic Press. – 1990.
11. Wilson, T. Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy / T. Wilson, C. J. R. Sheppard. London: Academic Press. – 1984.
12. Егорова О.В. С микроскопом на «ты». Шаг в XXI век. Световые микроскопы для биологии и медицины. М: «Репроцентр-М», 2006, 416с.
13. Ландсберг Г.С. Оптика. М., «Наука», 1976, 928с.
14. Штейн Г.И. Руководство по конфокальной микроскопии - СПб: ИНЦ РАН, 2007. - 77 с.; ил.
15. Haugland R.P. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. 6-th ed. Molecular Probes, 1996, 679p.
16. Горюнова, С.В. Воздействие анионного детергента на зеленую водоросль и проростки некоторых покрыто-семянных растений / С.В.Горюнова, С.А. Остроумов // Биол. Науки. - 1986. - №7. - С.84.
17. Макурина, О.Н. Исследования влияния ионов кадмия и некоторых поверхностно-активных веществ на содержание пигментов в тканях вод-

ного растения EGERIA DENSA / О.Н. Макурина, А.А. Косицына [и др.]// Известия Самарского научного центра Российской академии наук. - 2009. - Т. 11, №1(4). – С. 733-736.

18. Захаров, В.П. Микроскопический контроль сеточных эксплантатов / В.П. Захаров, П.Е. Тимченко, И.А. Братченко // Сборник конкурсных докладов VIII Всероссийский молодежный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике. - 2010. – С.155-161.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕР-
СИТЕТ ИМЕНИ академика С.П. Королева»
(Самарский университет)

Лабораторная работа
«Флуоресцентная конфокальная микроскопия»

Работу выполнил:
Студент гр.№
ФИО

Проверил:
ФИО преподавателя

Самара 201_

Учебное издание

Флуоресцентная конфокальная микроскопия

Методические указания к лабораторным работам

Составители: Тимченко Павел Евгеньевич

Тимченко Елена Владимировна

Самарский государственный национальный университет имени академика С.П. Королева» (Самарский университет)
443086 Самара, Московское шоссе, 34

Издательство Самарский университет
443086 Самара, Московское шоссе, 34

