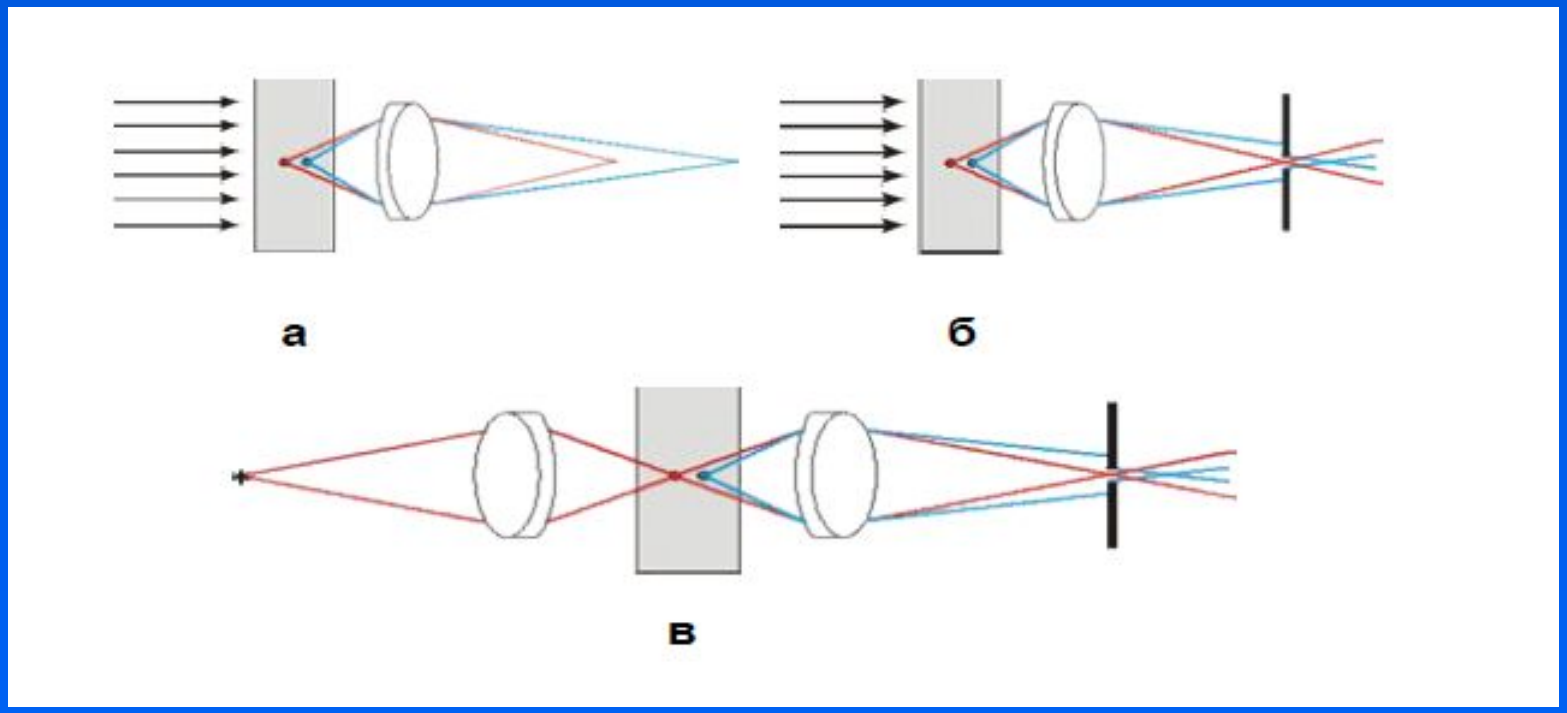
Лекция 4

Основы лазерной сканирующей конфокальной микроскопии

Пространственная фильтрация светового сигнала



а – широкопольная микроскопия, б- микроскоп с диафрагмой в ЗФП, в- конфокальный микроскоп

Краткая история

Патент М. Минского (1955, патент подан в 1957, выдан в 1961) – описана схема, но не было создано работающего образца с удовлетворительным разрешением, и не было картинок и публикаций.

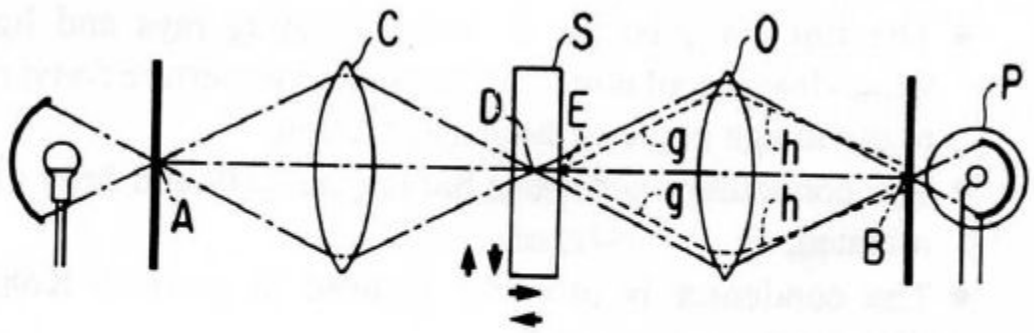
Тандемный сканирующий микроскоп (первая публикация, Science - 1967) – David Egger and Mojmír Petráň. Следующая публикация в 1968 г., патент выдан в 1970 г.

Первый лазерный сканирующий микроскоп – David Egger and Paul Davidovits (США) 1969 и 1971. Картинки получали с осциллографа, лазерный пучок был неподвижен.

1977 – теоретический анализ проблемы и введение термина «конфокальный микроскоп» (Colin J. R. Sheppard and A. Choudhury, Оксфорд, Великобритания)

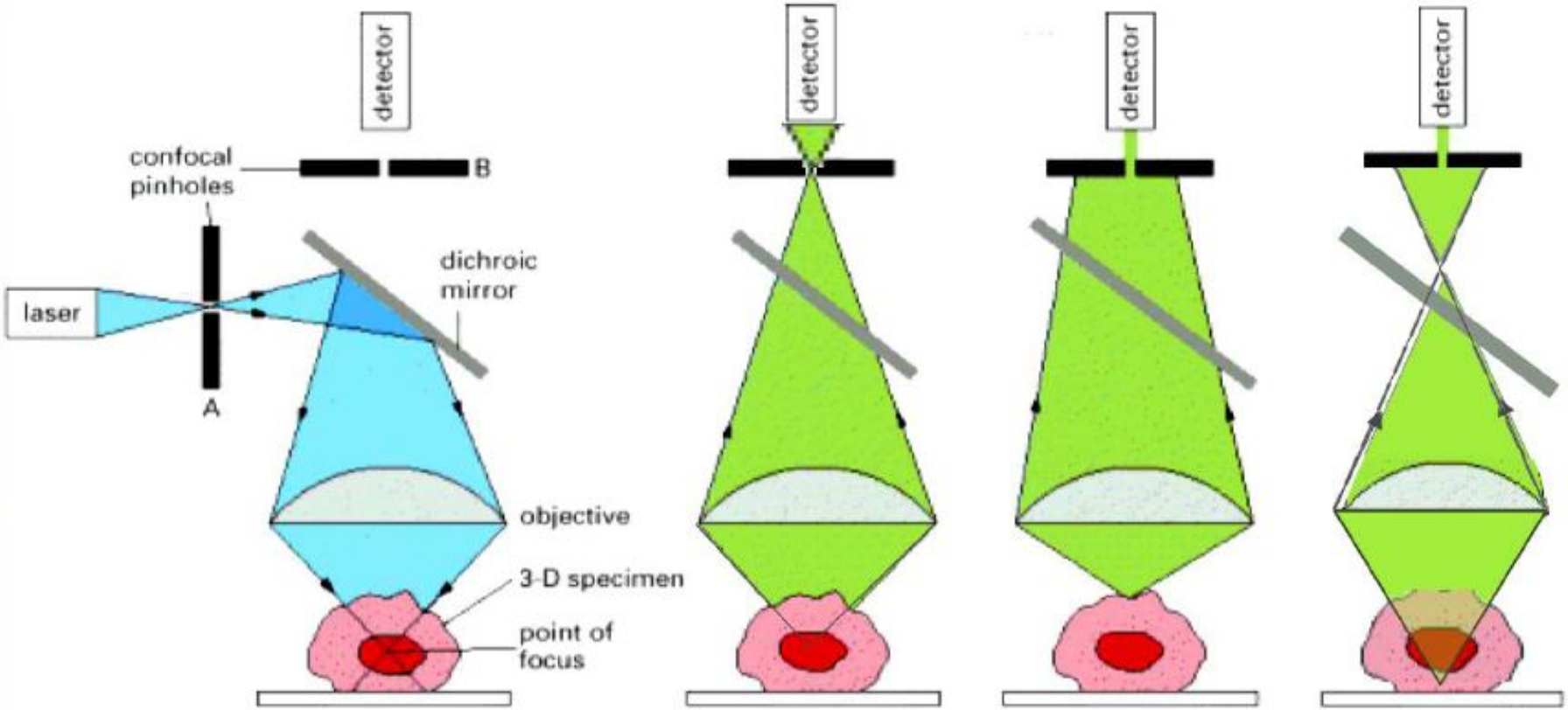
Середина 80-х - William Bradshaw Amos and John Graham White, создали MRC-500 (Кембридж, Великобритания). Впервые применено полноценное сканирование через неподвижный объектив с отклонением лазерного пучка гальванометрическими зеркалами (неподвижный объектив и препарат, растр 512*512)

Схема первого конфокального микроскопа



A, B – диафрагмы, C – конденсор, O – объектив, S – объект, P - фотоприемник

Принцип устройства

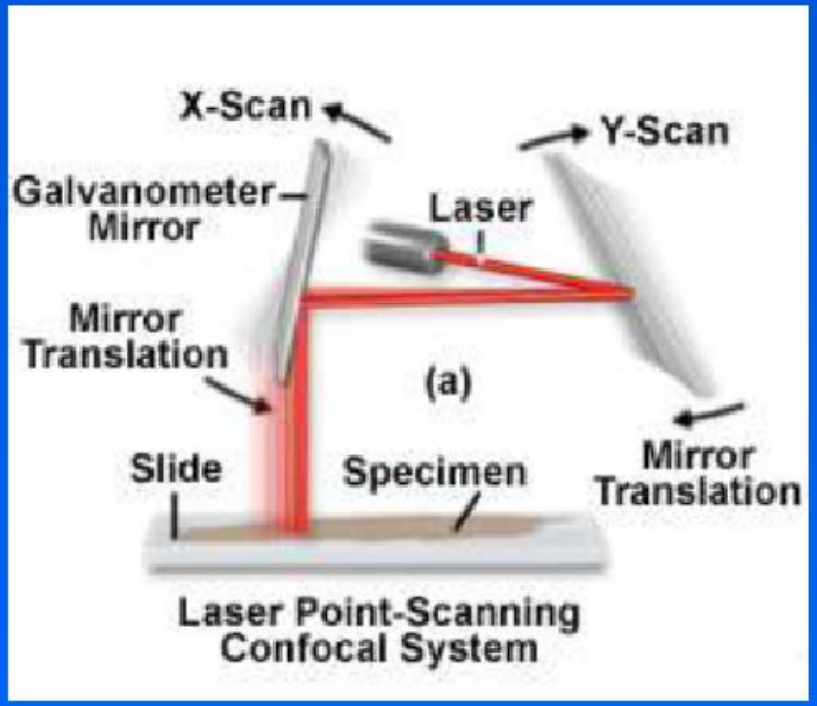


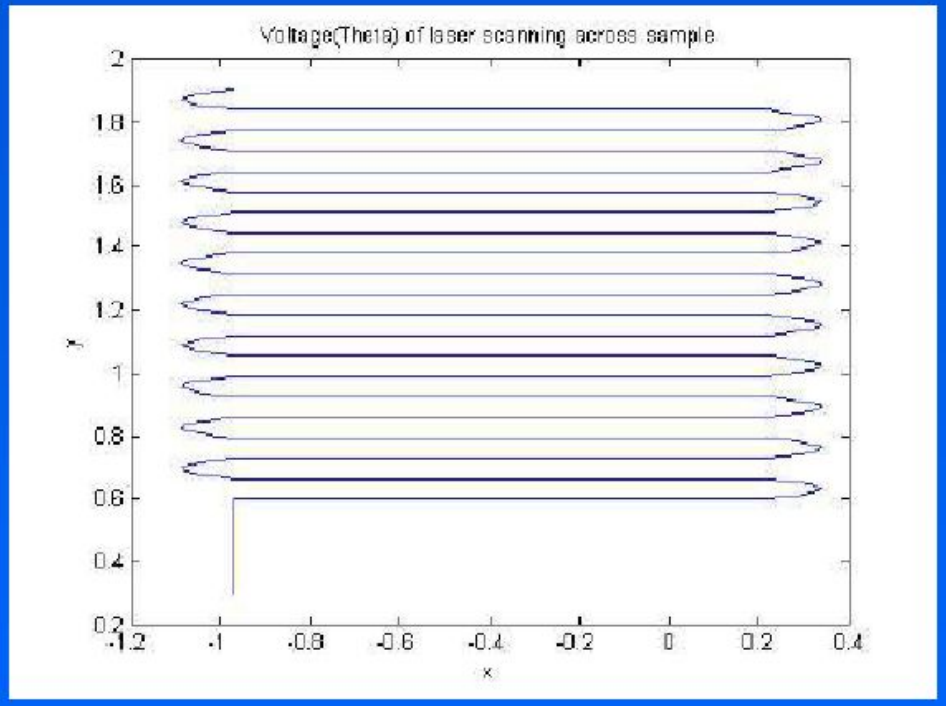
fluorescent specimen is illuminated with a focused point of light from a pinhole

emitted fluorescent light from in-focus point is focused at pinhole and reaches detector

emitted light from out-of-focus point is out of focus at pinhole and is largely excluded from detector

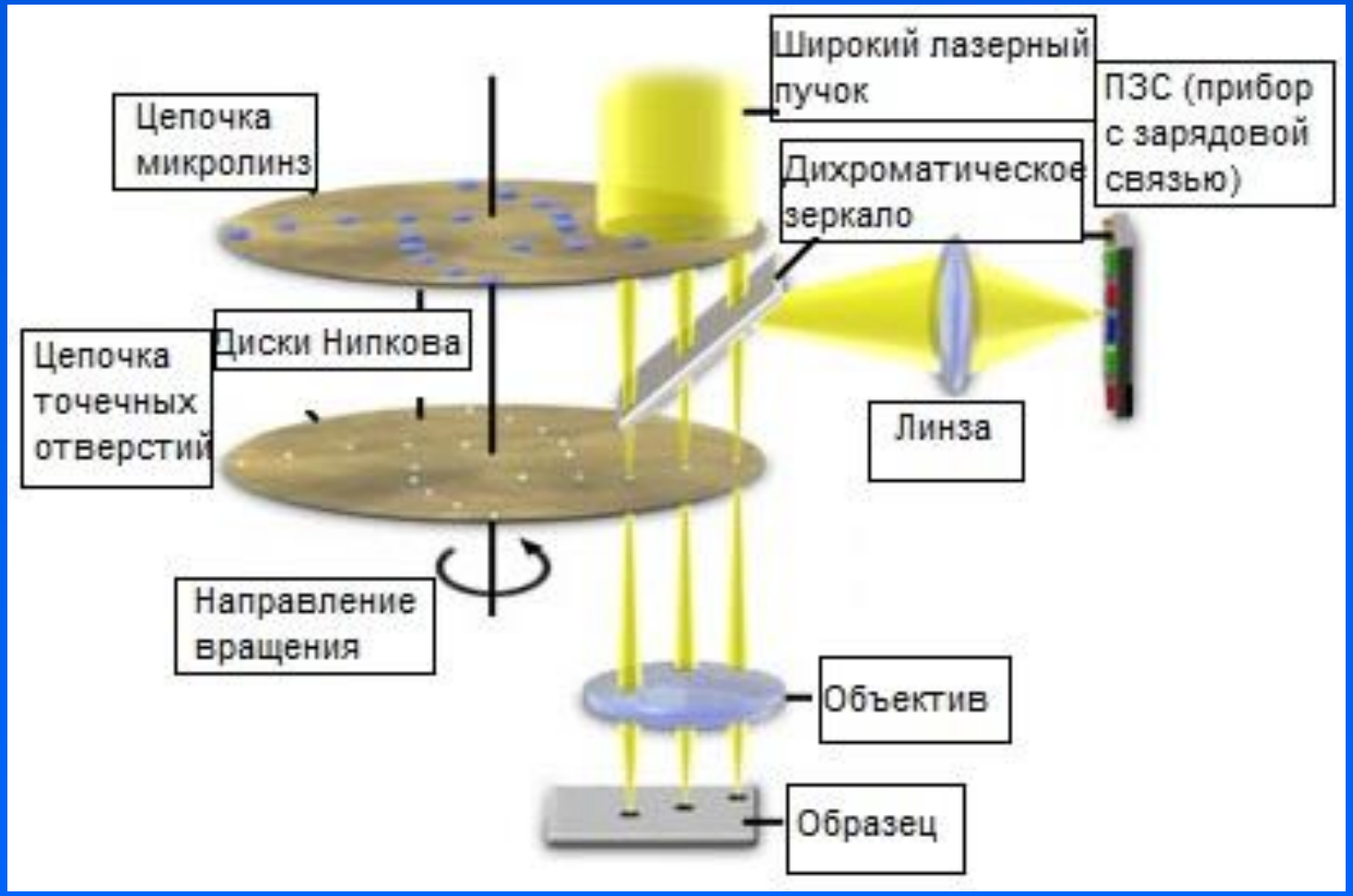
Схема лазерного сканирующего конфокального микроскопа



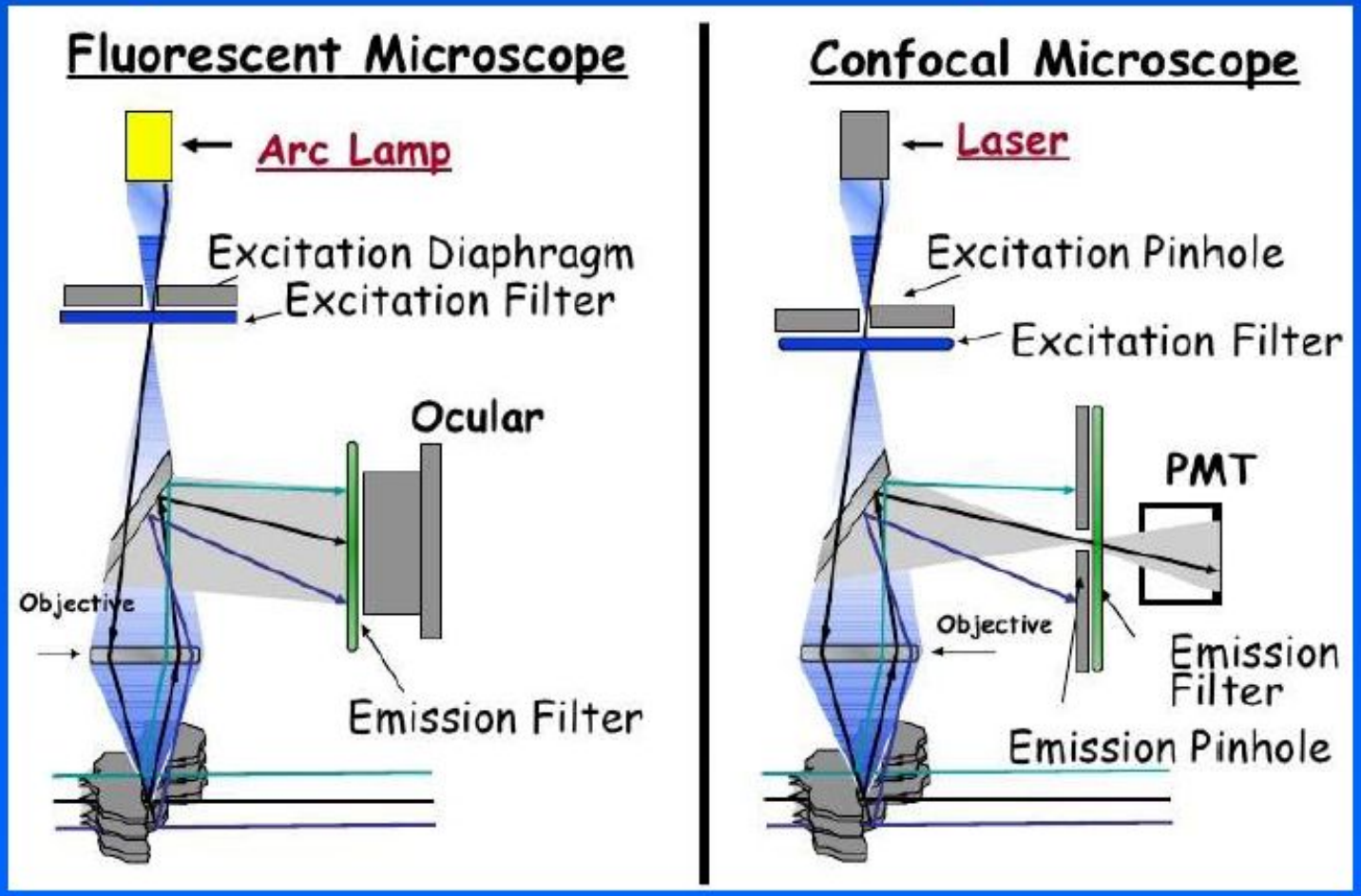


Препарат последовательно сканируется пучком света, проходящим через объектив, и отклоняющимся с помощью двух качающихся зеркал. Частота сканирования задается управляющей системой и составляет от 400 до 8000 циклов в секунду.

Схема конфокального микроскопа с двойным диском Нипкова



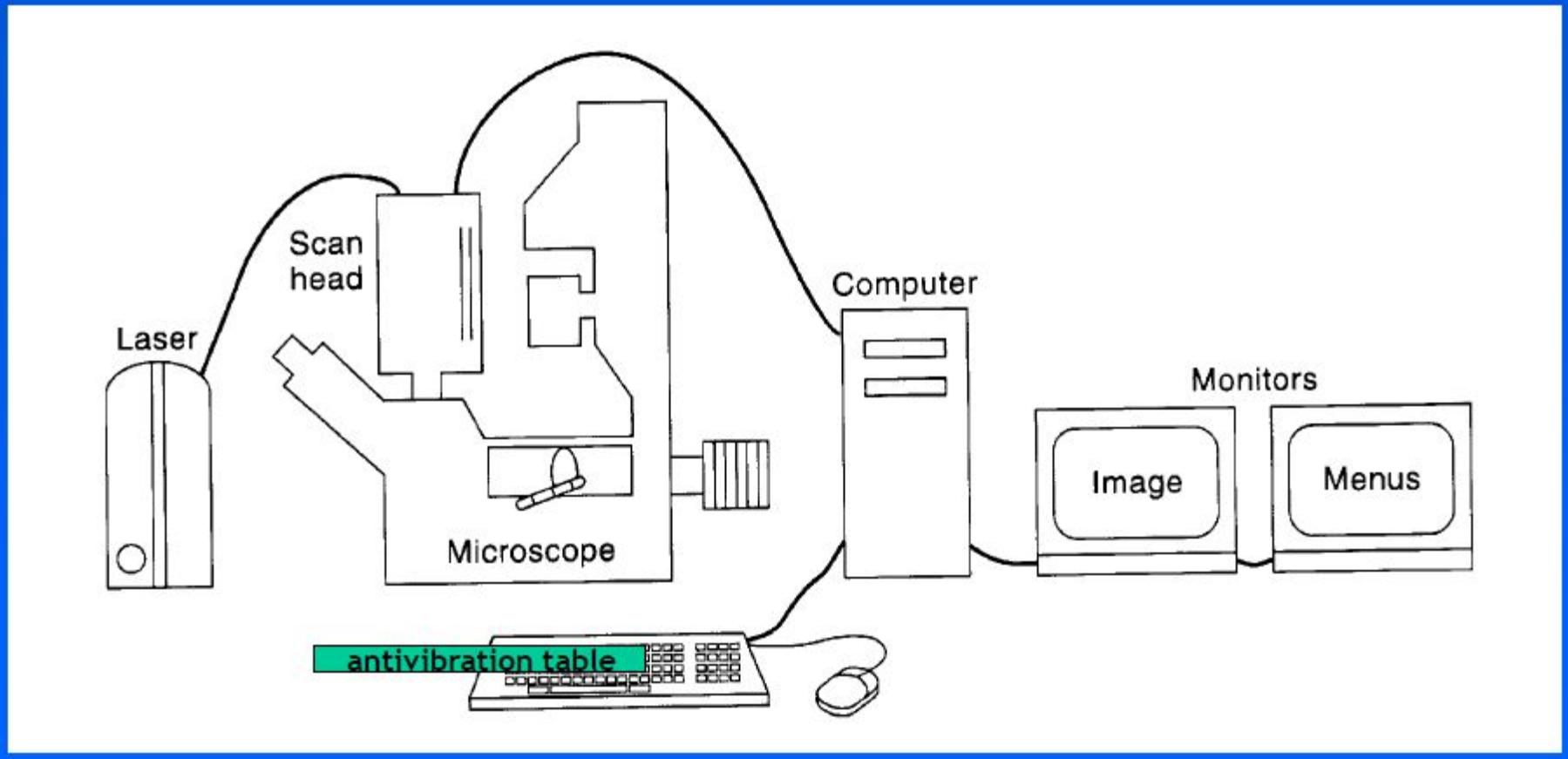
Сравнение лазерного сканирующего и широкопольного микроскопов



Conjugated focal plane = CONFOCAL

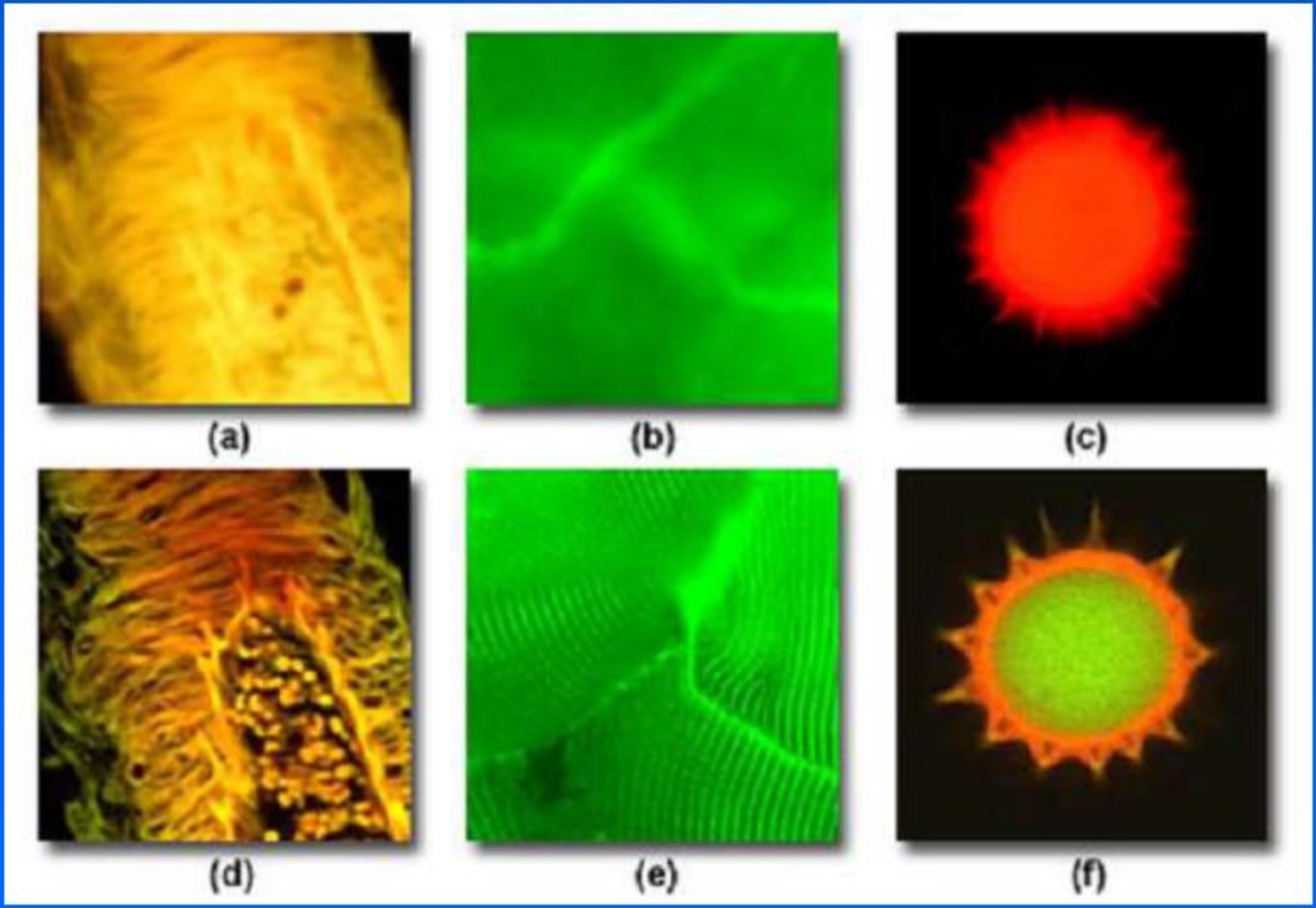
Две диафрагмы расположены так, что изображение одной из них проецируется микроскопом резко на плоскость другой

Блок-схема ЛСКМ

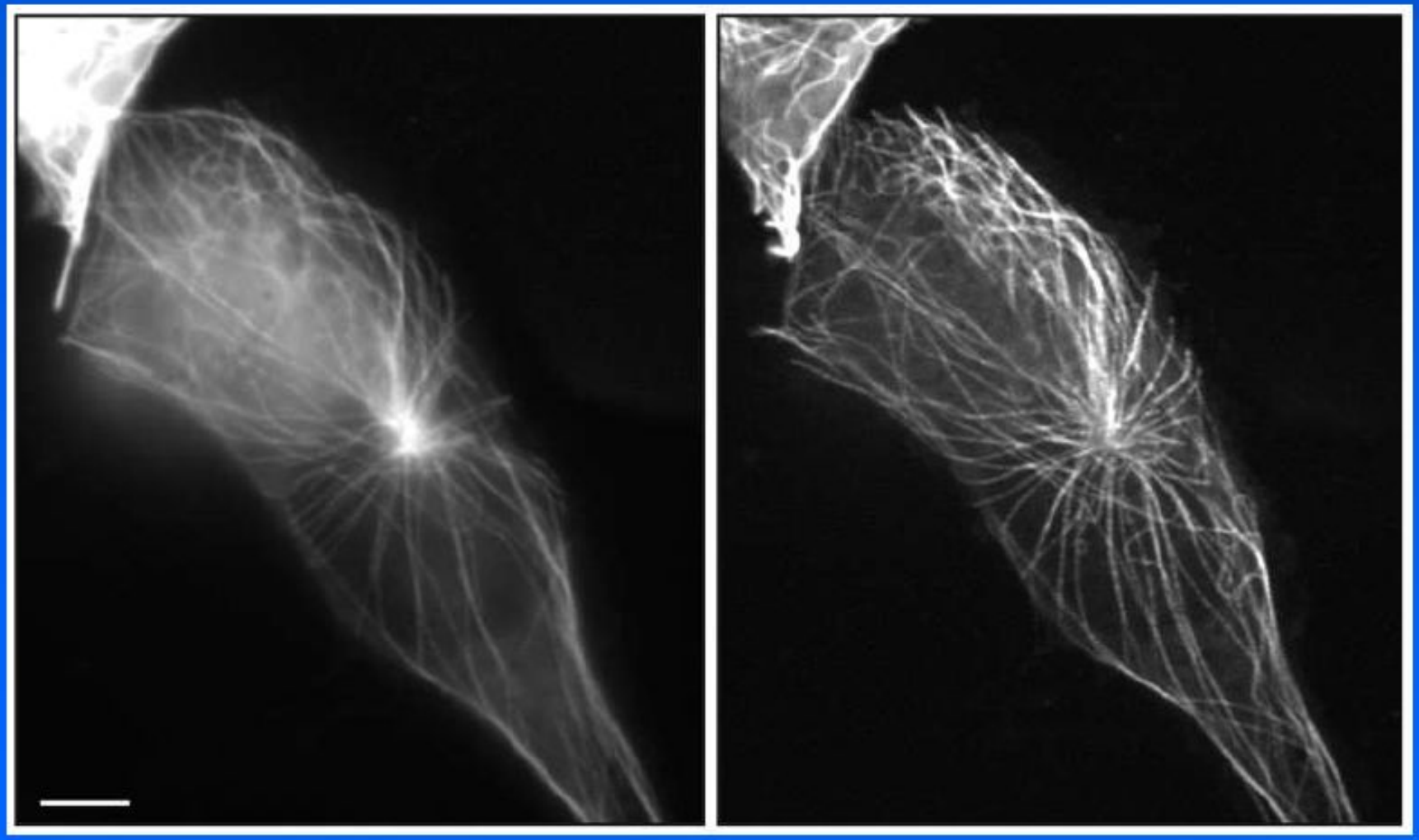


К микроскопу добавляются: лазер(ы) и система фокусировки их пучков; сканирующий модуль, включающий систему управления разверткой луча, ФЭУ и конфокальную диафрагму.

Широкопольная и конфокальная микроскопия (толстые препараты)

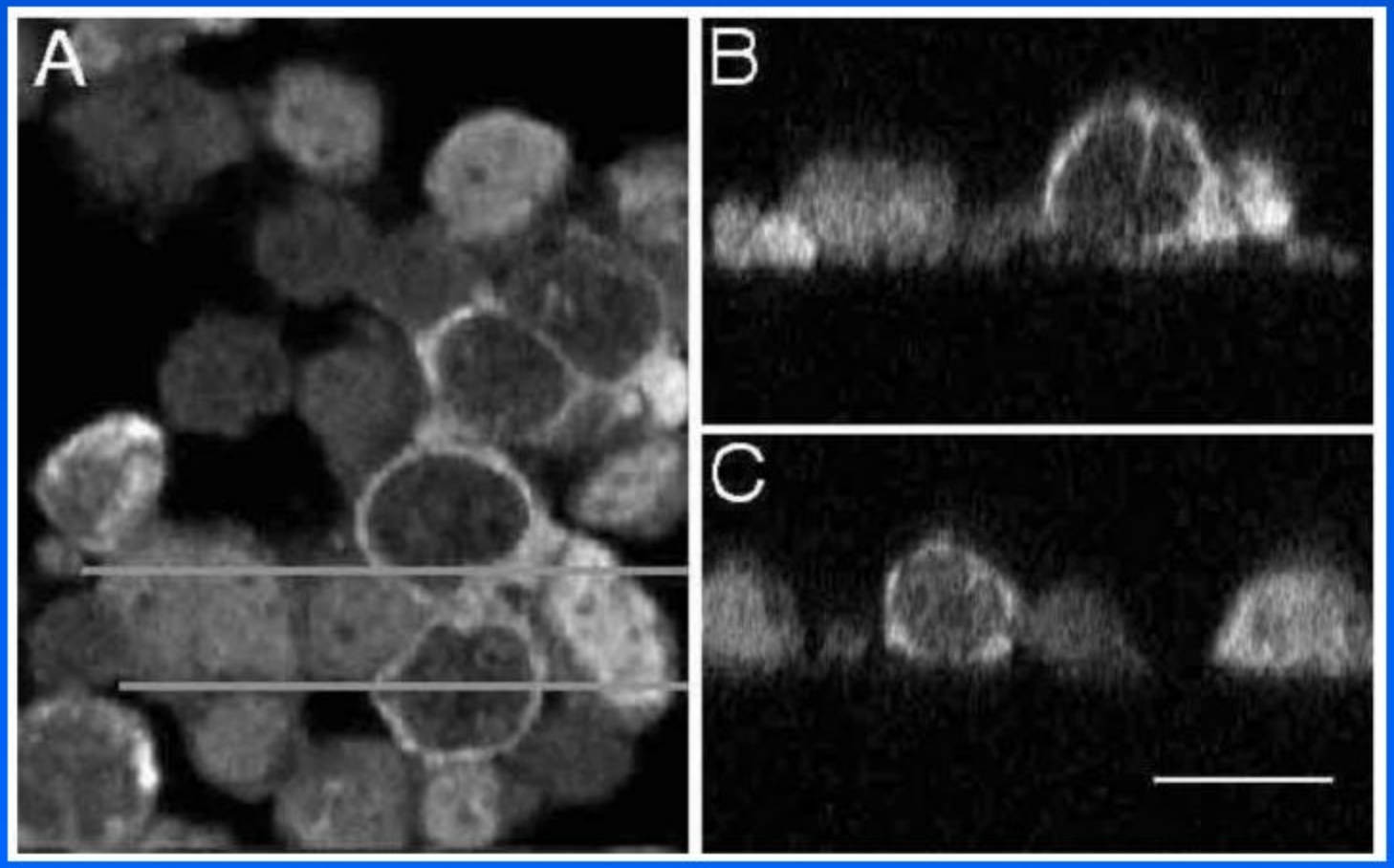


Широкопольная и конфокальная микроскопия (тонкий препарат)



Микротрубочки в живой клетке. Слева - обычная флюоресцентная микроскопия; справа - конфокальная система с диском Нипкова.

Съемка z-серии



A – вид сверху (в плоскости x-y). B и C – виды сбоку (в плоскости x-z) в разных частях изображения.

Преимущества конфокальной микроскопии

Более четкое изображение оптического среза

Возможность просмотра толстых препаратов

Возможность сканирования по оси Z

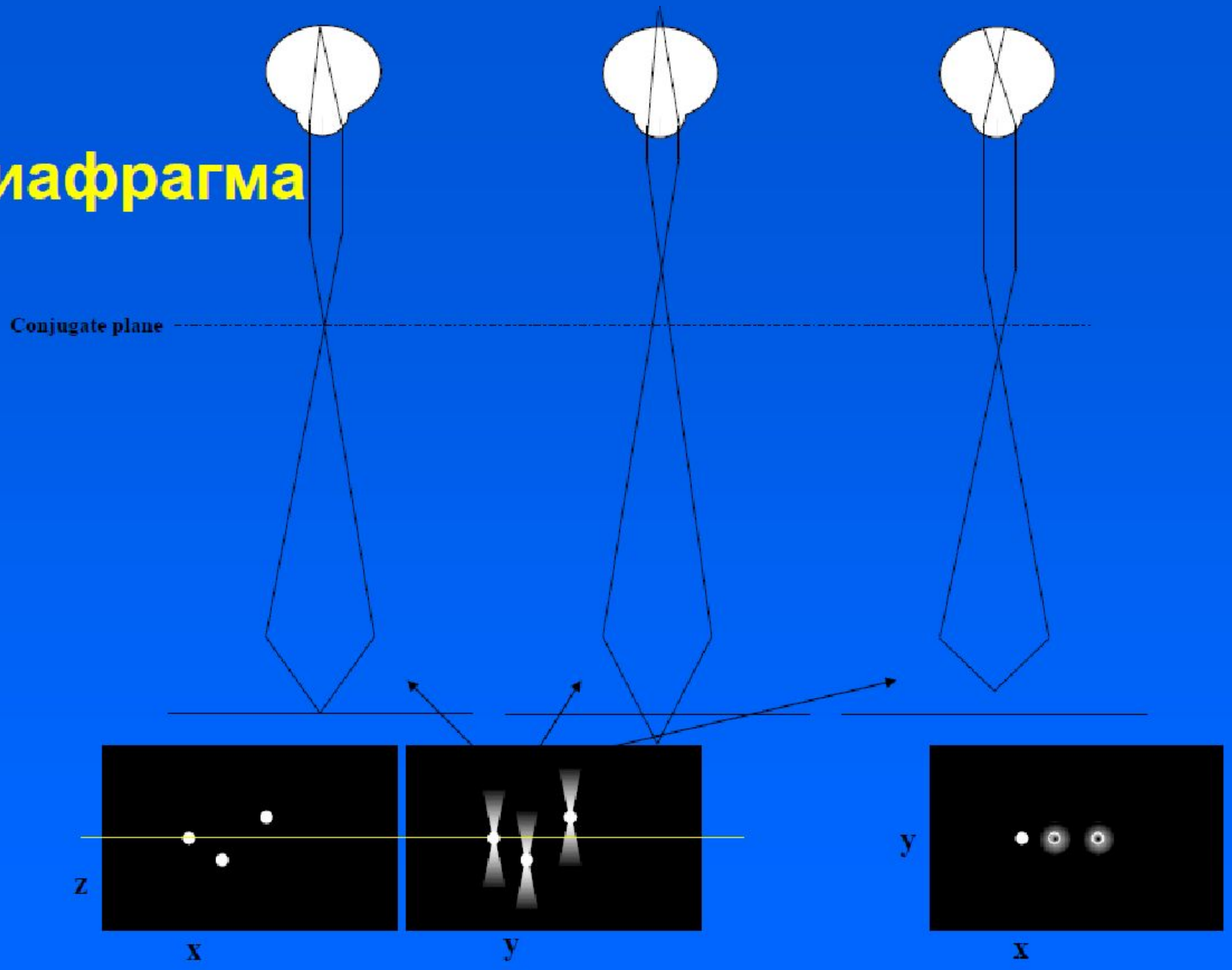
Улучшенное восприятие объемности образца

Увеличение может меняться электронным образом (без смены объектива)

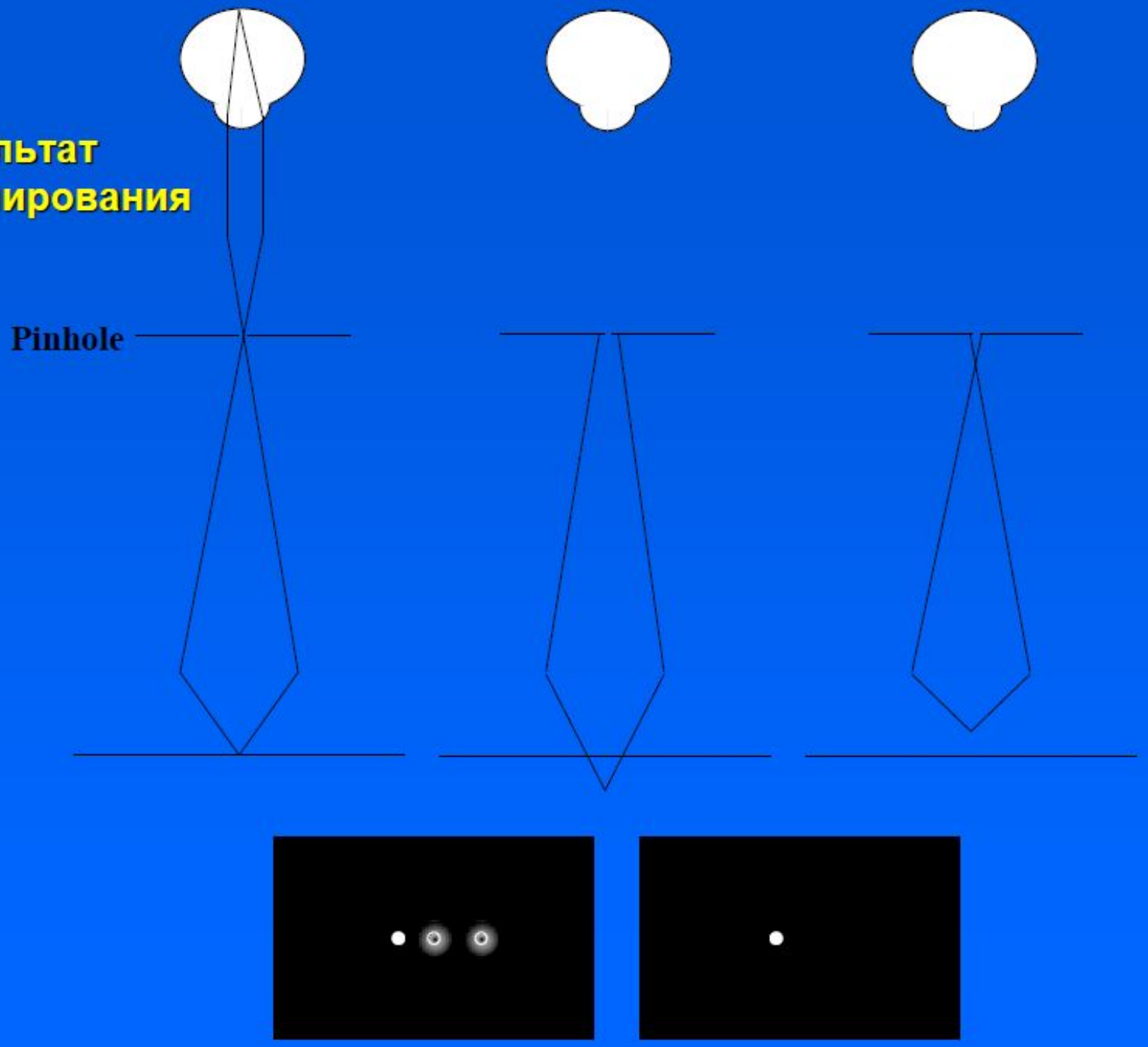
Увеличенное разрешение - миф

Увеличенное отношение сигнал/шум – чаще миф. Увеличенное отношение достигается только для величины сигнал/фон и для толстых препаратов

Диафрагма

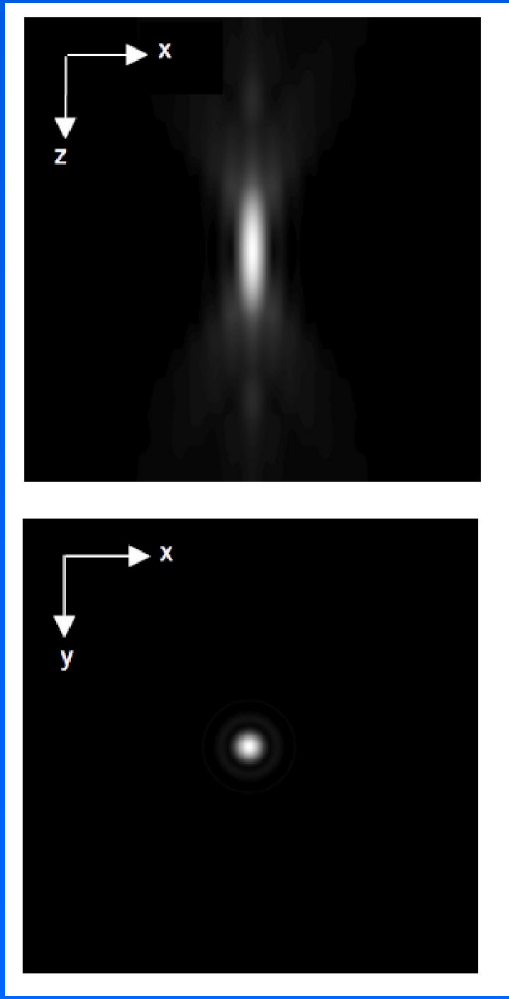


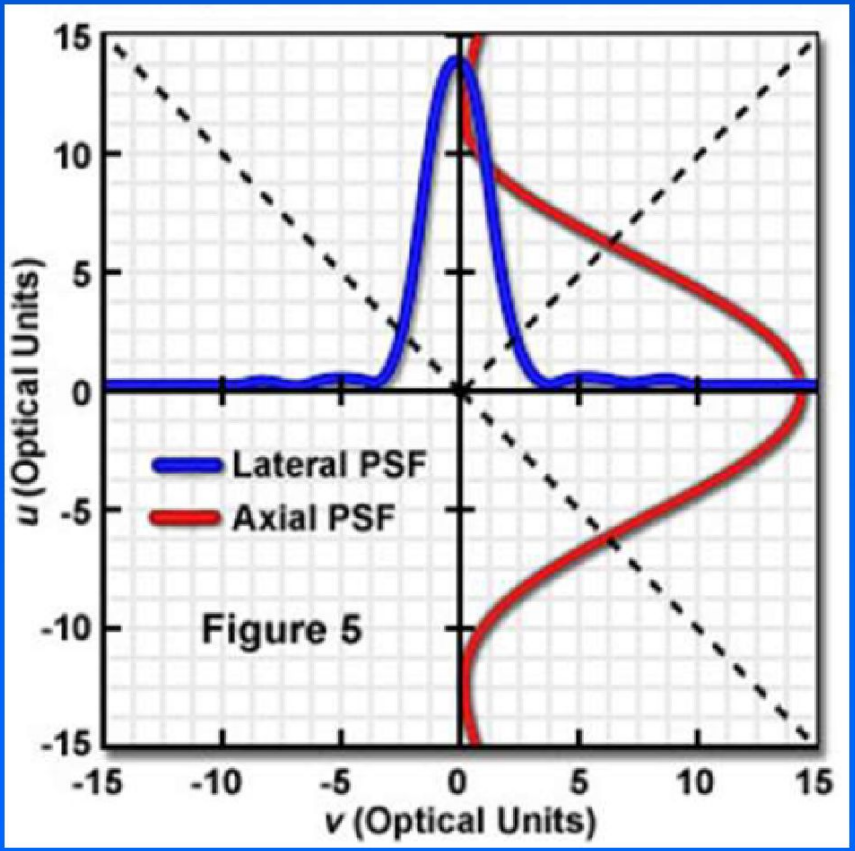
Результат диафрагмирования



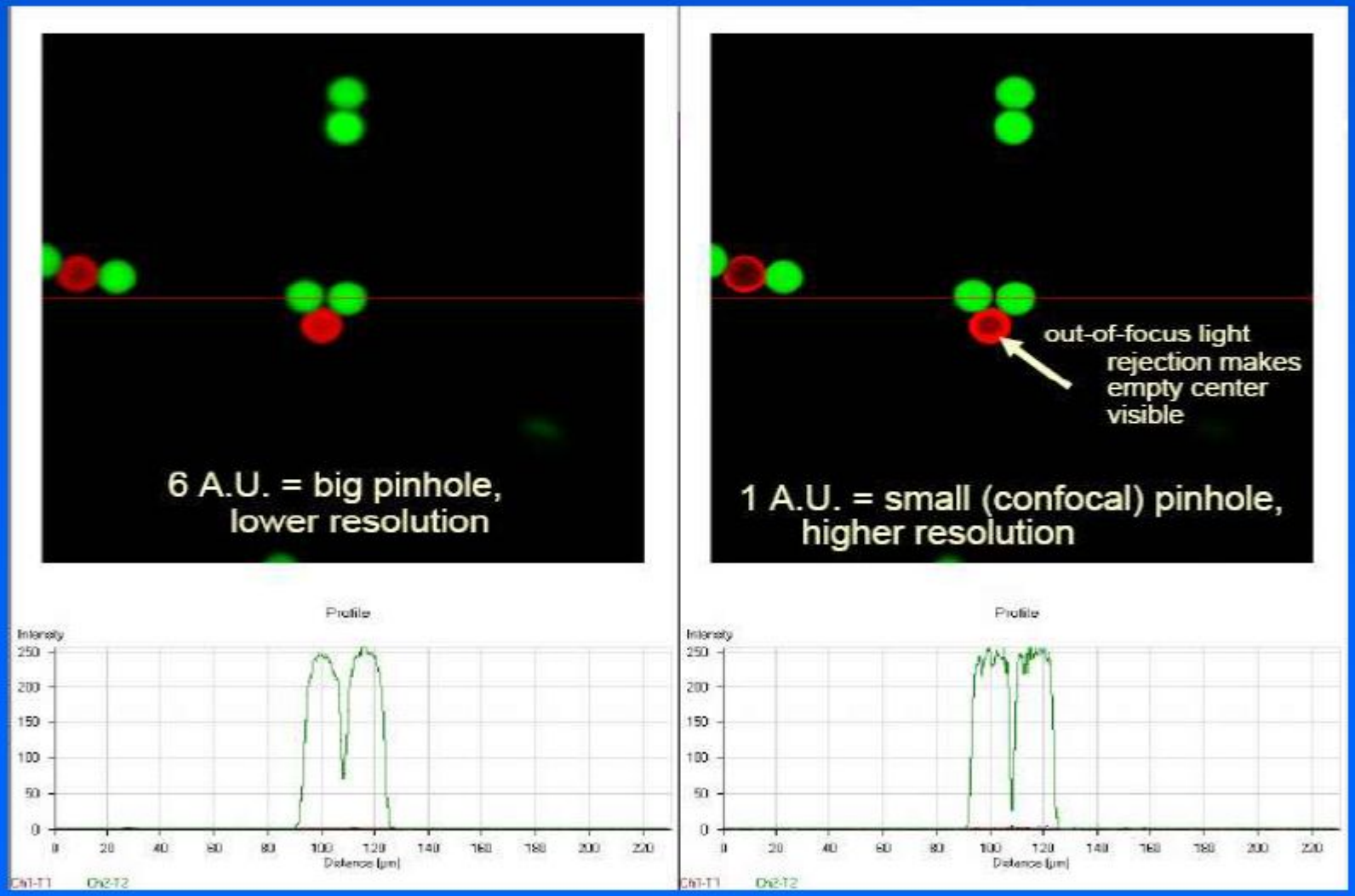
ФРТ определяет аксиальное и латеральное разрешение в ЛСКМ

$$PSF_{tot}(x,y,z) = PSF_{ill}(x,y,z) \otimes PSF_{det}(x,y,z) \qquad (1)$$

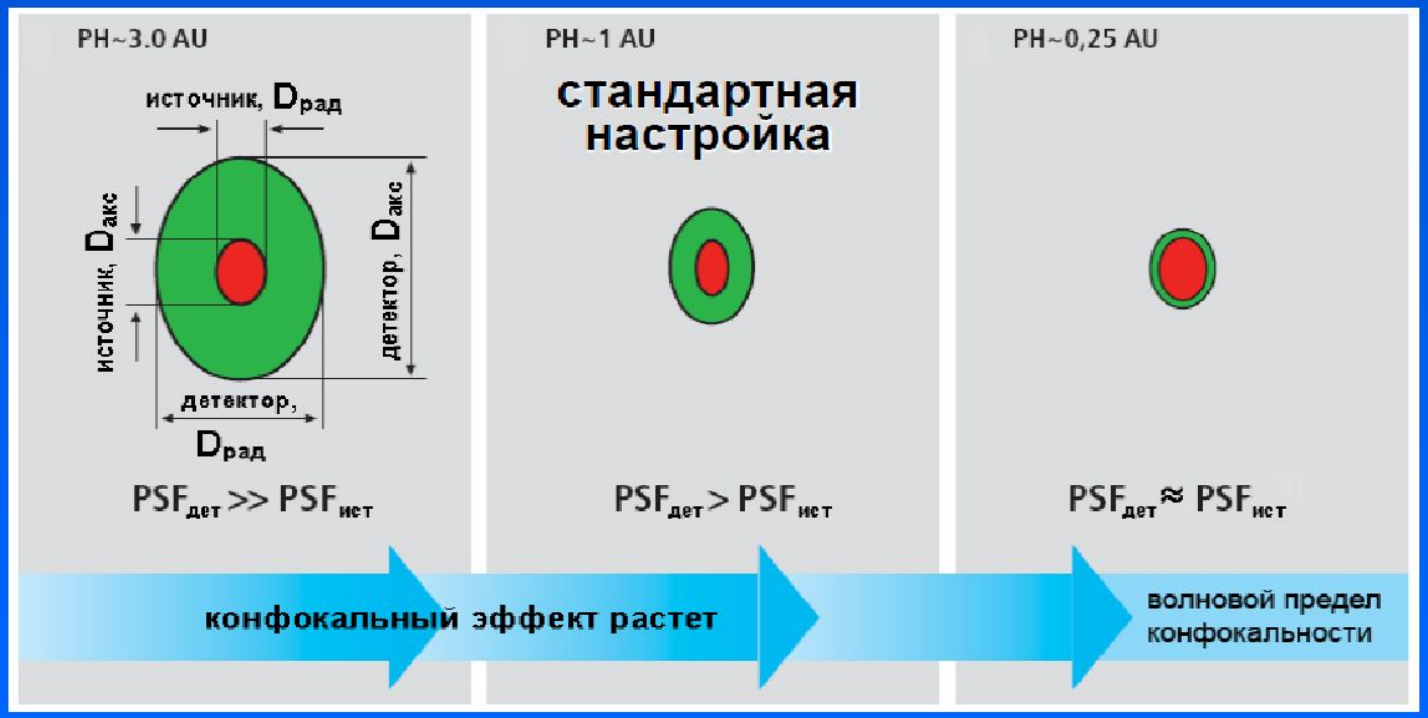




Эффект диафрагмирования



Зависимость конфокального эффекта от размера диафрагмы



Степень закрытия диафрагмы детектора определяет конфокальный эффект. Эффект практически отсутствует при размере диафрагмы свыше 3 AU.

$$1AE = \frac{1.22 \cdot \lambda}{NA}$$

NA = numerical aperture of the objective

λ *= wavelength of the illuminating laser light*

$$1RE = \frac{n \cdot \lambda}{NA^2}$$

n = refractive index of immersion liquid

PH>>1AU

Разрешение

Axial:

$$FWHM_{ill,axial} = \frac{0.88 \cdot \lambda_{exc}}{(n - \sqrt{n^2 - NA^2})} \qquad (2)$$

n = refractive index of immersion liquid, NA = numerical aperture o the microscope objective, λ_{exc} *= wavelength of the excitation light*

If NA < 0.5, equation (2) can be approximated by:

$$\approx \frac{1.67 \cdot n \cdot \lambda_{exc}}{NA^2} \qquad (2a)$$

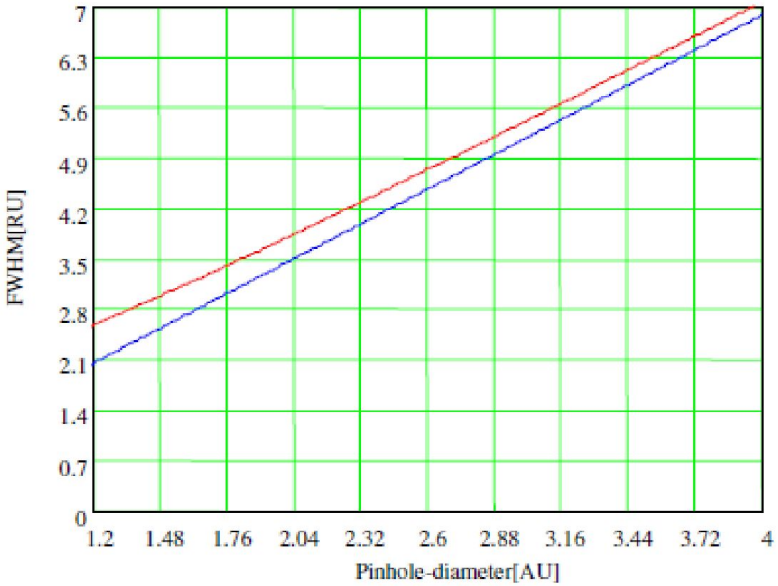
Lateral:

$$FWHM_{ill,lateral} = 0.51 \frac{\lambda_{exc}}{NA} \qquad (3)$$

Глубина резкости

$$FWHM_{det,axial} = \sqrt{\left(\frac{0.88 \cdot \lambda_{em}}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}}\right)^2 + \left(\frac{\sqrt{2} \cdot n \cdot PH}{NA}\right)^2} \qquad (4)$$

λ_{em} *= emission wavelength*
PH = object-side pinhole diameter [µm]
n = refractive index of immersion liquid
NA = numerical aperture of the objective



$$1AE = \frac{1.22 \cdot \lambda}{NA}$$

$$1RE = \frac{n \cdot \lambda}{NA^2}$$

NA = numerical aperture of the objective

λ *= wavelength of the illuminating laser light*

n = refractive index of immersion liquid

PH< 0.25 AU

Axial [3]:

$$FWHM_{tot,axial} = \frac{0.64 \cdot \bar{\lambda}}{(n - \sqrt{n^2 - NA^2})} \qquad (7)$$

If NA < 0.5, equation (7) can be approximated by

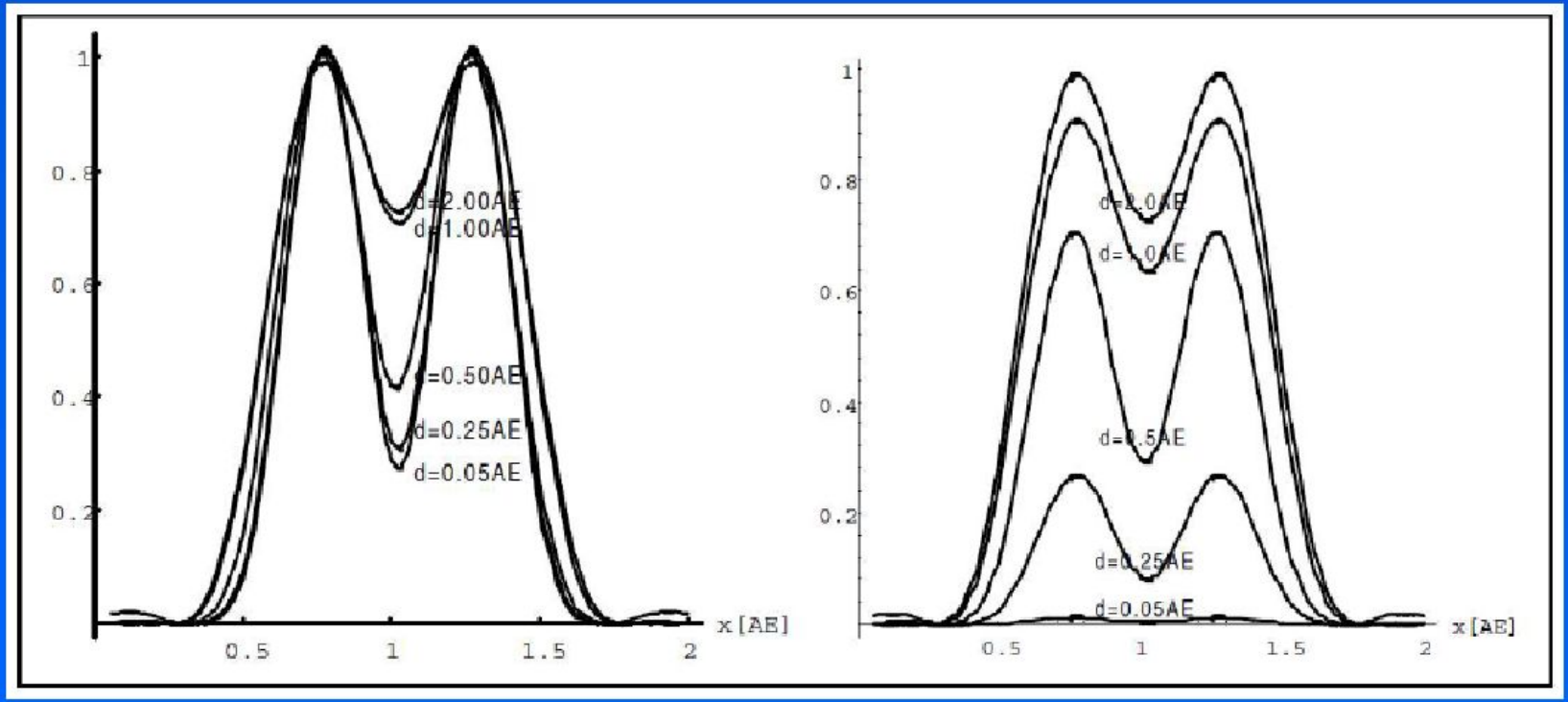
$$\approx \frac{1.28 \cdot n \cdot \bar{\lambda}}{NA^2} \qquad (7a)$$

Lateral:

$$FWHM_{tot,lateral} = 0.37 \frac{\bar{\lambda}}{NA} \qquad (8)$$

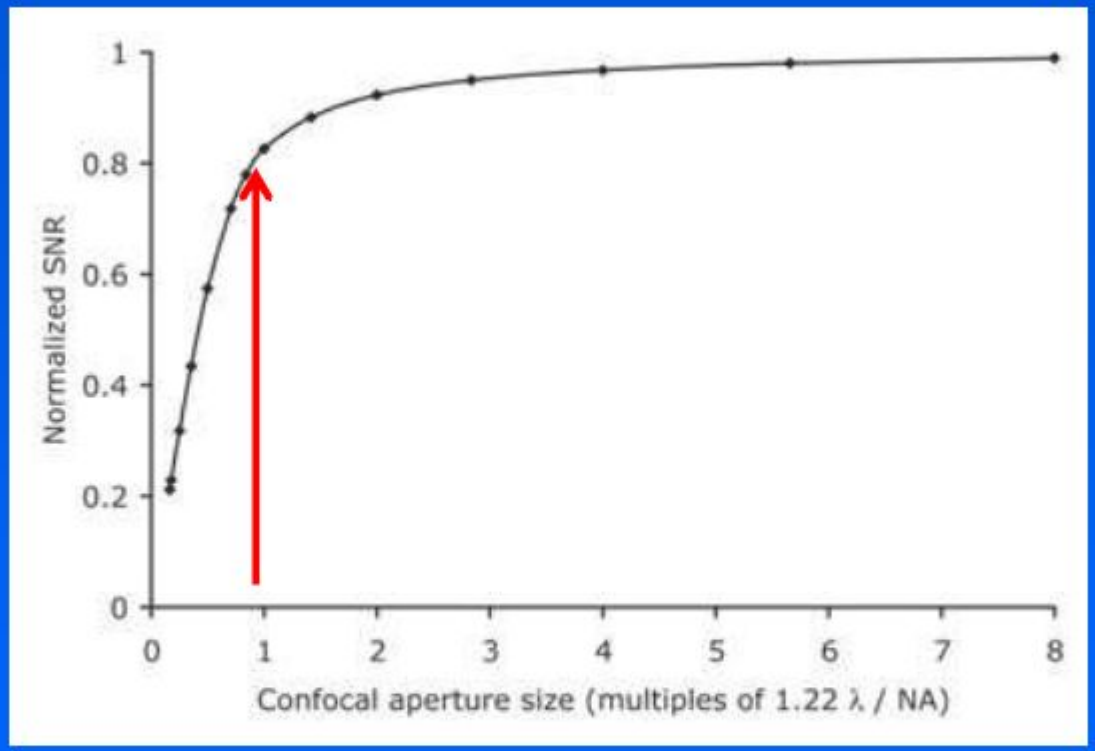
$$\bar{\lambda} \approx \sqrt{2} \frac{\lambda_{em} \cdot \lambda_{exc}}{\sqrt{\lambda_{exc}^2 + \lambda_{em}^2}} \qquad (6)$$

Влияние размера диафрагмы на контраст и яркость изображения



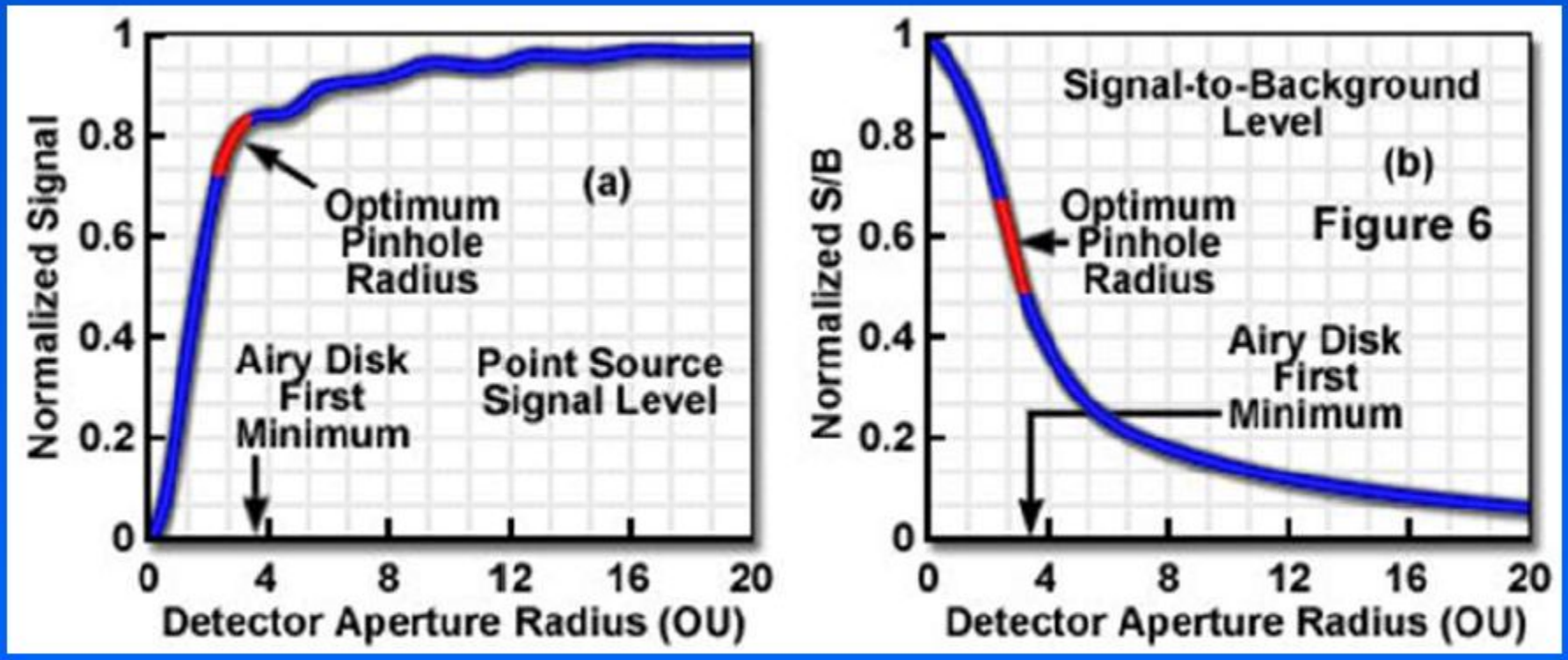
контраст яркость

Влияние размера диафрагмы на отношение сигнал/фон



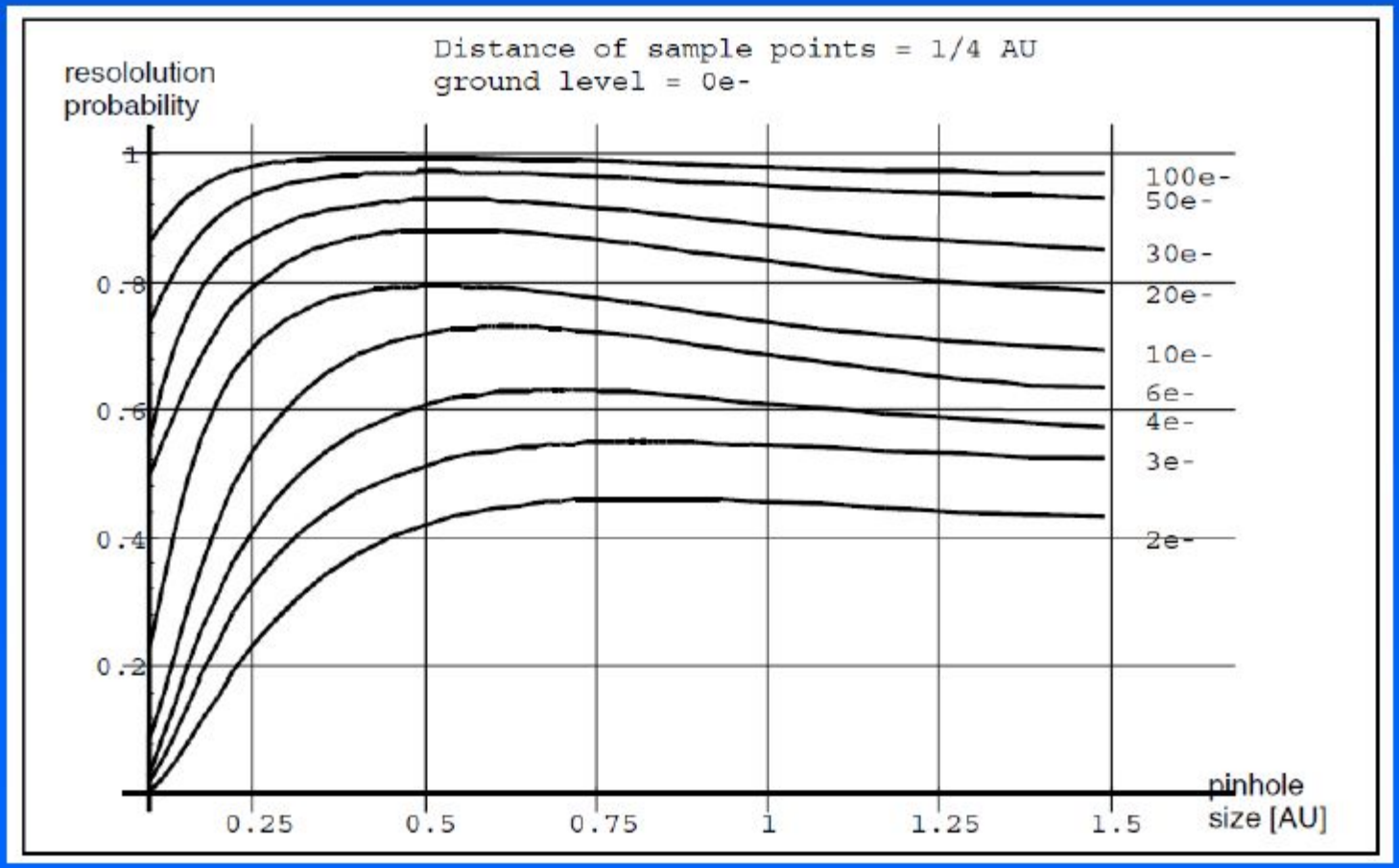
По мере раскрытия диафрагмы детектора возрастает величина сигнала. Эффективная апертура – 80-100% диска Эри. Меньшая апертура приводит к значительной потере света, и, в результате, к снижению отношения сигнал/шум. Рекомендуемый размер диафрагмы – около 1 диаметра диска Эри (то есть примерно 25 мкм для объектива x60/1.4).

Влияние размера диафрагмы на яркость и отношение сигнал/шум



Зависимость между размером диафрагмы и величиной сигнала нелинейная. «Оптимальный» диаметр диафрагмы находится в области перегиба. Поэтому даже незначительное дополнительное закрывание диафрагмы приводит к быстрому уменьшению отношения сигнал/шум.

Влияние величины сигнала на вероятность разделения объектов



Диафрагмирование: резюме

На практике, размер диафрагмы важен для контроля толщины оптических срезов, но не для улучшения разрешения в плоскости x-y.

В некоторых случаях размер диафрагмы может быть увеличен, чтобы больше света попадало на детектор. Это позволяет улучшить отношение сигнал/шум, но за счет снижения конфокального эффекта (снижения отношения сигнал/фон и получения более размытых оптических срезов).

Таким образом, наряду с «оптимальным» размером диафрагмы около 1 диска Эри, на практике приходится использовать большие размеры – 1,5-3 диска Эри.