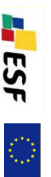


Mikroskopijas metodes

1. Video un konfokālā lāzerskenējošā mikroskopija

1 kp. - 16 stundas
Lekcijas - 4 stundas
Praktiskie darbi - 10 stundas
Seminārs – 2 stundas
Patsīstīvais darbs – datu apstrāde un prezentācija seminārā
Kods Biol5027



Dr. biol. Tūrs Selga

Saturs

- 1. Videomikroskopijas pamati.
- 2. Konfokālais lāzerskenējošais mikroskops un tā sagatavošana darbam.
- 3. Lāzeru un filtru izvēle. Fluorohromu izvēle preparātu analīzei.
- 4. Konfokālā lāzerskenējošā mikroskopa preparātu attēli un to aberācijas.
- 5. Programnodrošinājums konfokālajā lāzerskenējošajā mikroskopijā un tā izmantošana attēlu un videomateriālu rediģēšanai un mērījumu iegūšanai.
- 6. Seminārs "Videomikroskopija un konfokālā lāzerskanējošā mikroskopija".

Videomikroskopijas pamati

- Videomikroskopijas priekšrocības.
- Digitālās foto un video iekārtas.
- Iekārtu pieslēgšana mikroskopam un datoram.
- Attēla iegūšana.
- Datorprogrammas un to izmantošana videomikroskopijā.
- Attēlu rediģēšana.

Videomikroskopijas priekšrocības

- Kvalitatīvu un lēnu attēlu vai videofilmu iegūšana.
Cik izmaksā viena publicēšanai piemērota krāsaina fotogrāfija, viena fotogrāfija no fotoplates un viens fails, ja normāli iegūst vienu īpaši kvalitatīvu attēlu no 100 nofotografētiem?
- Attēls ir zinātnisks fakts.
- Videofilmu izmanto organoīdu, šūnu un organismu kustību, citoskeleta aktivitātes, gēnu ekspresijas u.c. dokumentēšanai **reālā laikā**, nodrošinot **kvalitāti**.
- Videofilmas ir atrodamas žurnālu elektroniskajos pielikumos.

Video 1 - *Paramecium* kustības;

video 2 – rauga kustība elektriskajā laukā;

video 3 – organoīdu kustība;

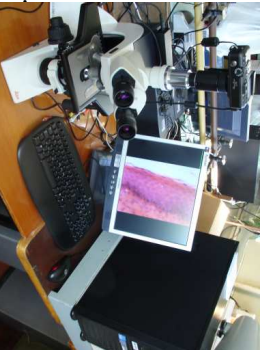
video 4 un 5 – sērījveidā skenēta organoīdu kustība.

Digitālās foto un video iekārtas

- Digitālais fotoaparāts.
- Videokamera.
- CCD kamera.

Digitālais fotoaparāts

- **Priekšrocības:**
Salīdzinoši liels punktu skaits.
Zema cena.
- **Trūkumi:**
Mazs dziļuma asums,
Trokšņi.



CCD kamera

- **Priekšrocības:**
Liels dziļuma asums.
Maz trokšņu.
Speciālas attēlu apstrādes un mērīšanas programmas.
- **Trūkumi:**
Augsta cena.
Salīdzinoši mazs punktu skaits.



Mikroskopa adapteris

- Veidots no gaismas necauraidīgas caurules un okulāra lēcu komplekta, kas pieskrūvējams pie mikroskopa foto izejas vai ievietojamns okulāra vietā.
- Pie mikroskopa adaptera nepieciešams nekustīgi fiksēt foto/video iekārtu.
- Svarīgs ir lēcas diametrs.
- Vēlams, lai gaismas stari ietu paralēli.



Videokamera

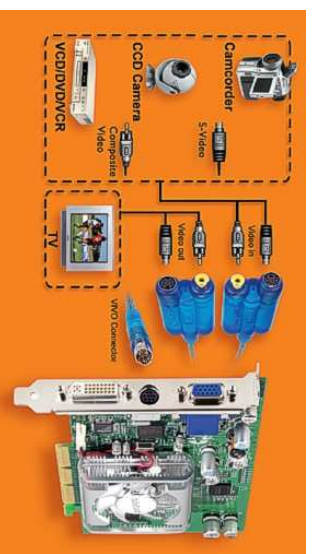
- **Priekšrocības:**
Liels dziļuma asums.
Vidēja cena.
Iespēja ilgstoši filmēt.
Iespēja eksportēt video attēlu digitālā formātā.
- **Trūkumi:**
Salīdzinoši mazs punktu skaits.
Trokšņi.



Iekārtu pieslēgšana mikroskopam un datoram

- Mikroskopa adapteris.
- Attēlu "grabberis" jeb "vivo" karte.
- "Fireware".

"vivo" karte analogā signāla pārvēršanai par digitālo.



Fireware

- Tā ir datora karte, kas nodrošina lielu datu pārrādīšanas ātrumu.
- Foto/video iekārtu var regulēt no datora (attēla asums u. c.).
- Foto/video iekārtas ar šādu regulēšanu ir retāk pieejamas un dārgākas.

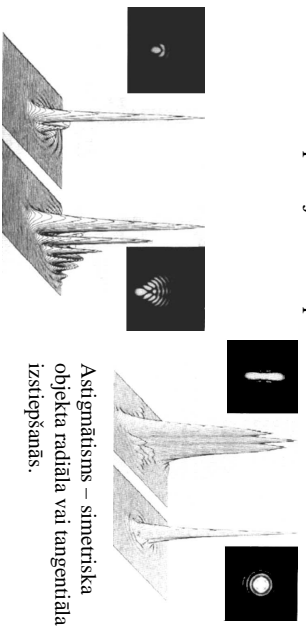


Attēla iegūšana

- Attēlu pirms ierakstīšanas apskata uz datora monitora reālā laikā.
- Attēlu ieraksta foto/video iekārtas atmiņā (vēlams izmantot tālvadības pulti).
- Attēlu ieraksta datora atmiņā ar atbilstošu datorprogrammu.

Monohromatiskās aberācijas

Veidojas no nepareizi savienota fotoaparāta un mikroskopa adaptera, mikroskopa adaptera lēcu vai mikroskopa objektīva nepiemērotības rezultātā.



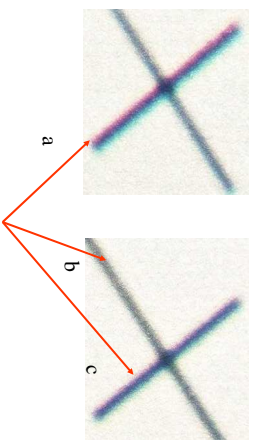
Astigmātisms – simetriska objekta radiāla vai tangentiāla izstiepšanās.

Koma – radiāla izstiepšanās no optiskās ass.

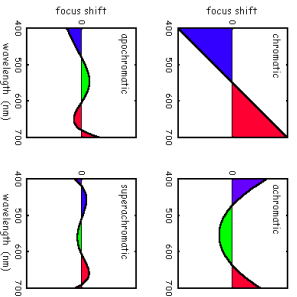
Hromatiskās aberācijas

Veidojas no neatbilstošu mikroskopa objektīvu vai mikroskopa adaptera lēcu izmantošanas.

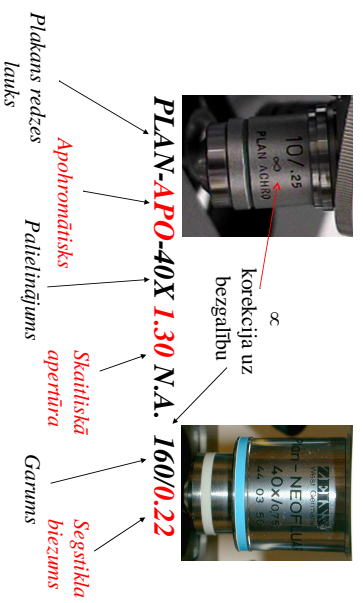
Vēlams izmantot planapohromātiskus objektīvus un adapteri bezgalībā vērstu okulāra lēcu komplektu.



a- izteikta hromatiskā aberācija, b – hromatiskā aberācija nav redzama, c – mazāk izteikta hromatiskā aberācija kā "a" piemēra.



Chivēka acs visvairāk uztver zaļo gaismu. Tāpēc, ja hromatiskas lēcas ir fokusētas uz zaļo spektra daļu, tad ziliens un sarkanais spektrs nebūs ass. Fotokārtu lēcām veic hromatisko korekciju ziliņā un sarkanajā spektra daļā.

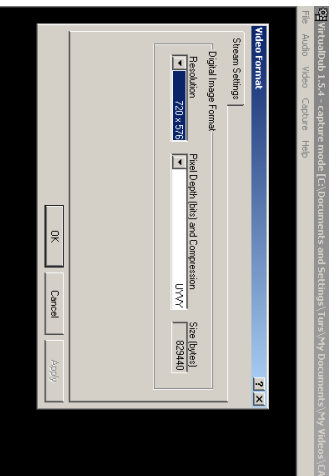


Datorprogrammas un to izmantošana videomikroskopijā

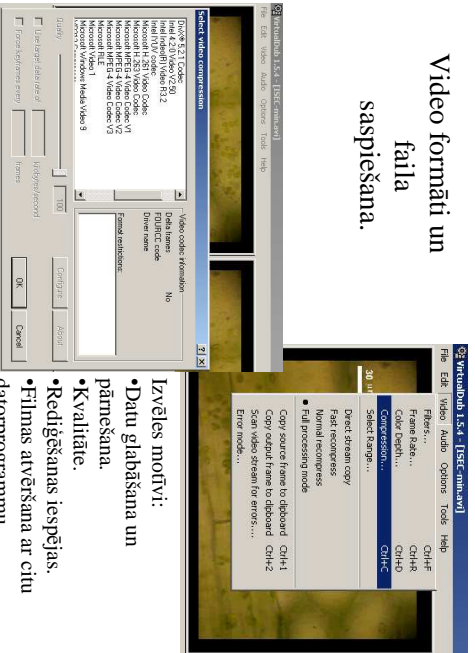
- **Brīvpieejas programmas:**
 - “Virtual Dub”, “Inter Video Win DVD creator”, “Paint Shop Pro”.
 - Priekšrocības: bezmaksas, mazs apjoms uz diska, ātra darbība.
 - Trūkumi: ierobežotas attēla apstrādes iespējas.
- **Licenzētas programmas:**
 - “ImagePro” u.c.
 - Priekšrocības: plašākas attēla apstrādes iespējas, veido savas datu bāzes.
 - Trūkumi: dārgas, liels apjoms uz diska, lēna darbība.

“Virtual Dub” izmantošana attēla kontrolei un ierakstīšanai

- Attēla pieprasīšana: File/Capture AVI.
- Attēla izšķirtspējas regulēšana.



Video formātū un faila saspiešana.



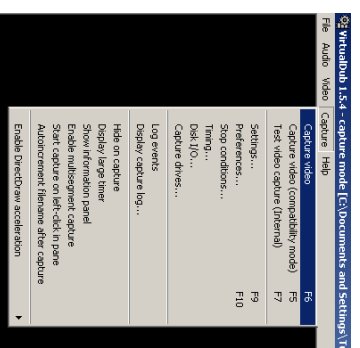
- Izvēles motīvi:**
- Datu glabāšana un pārvešana.
 - Kvalitāte.
 - Rediģēšanas iespējas.
 - Filmas atvēršana ar citu datorprogrammu.

Datorprogrammas un attēla ierakstīšana

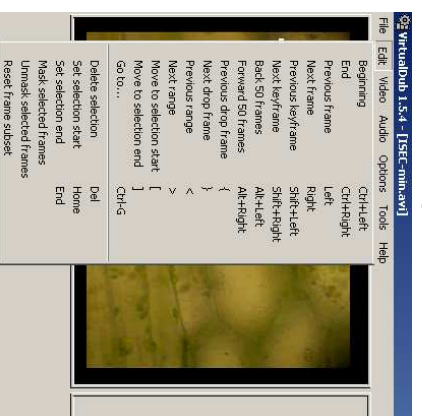
- Ieraksta foto/video iekārtā un pārsūta uz datoru.
- Nav nepieciešams izmantot programmas, kas uz monitora parāda mazu un nekvalitatīvu attēlu.

- Filmēšanas režīms.

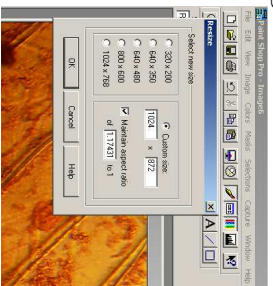
Video: Amēģa



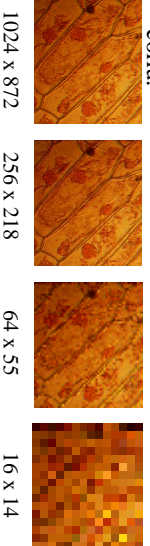
Attēlu izgriešana



Attēlu rediģēšana

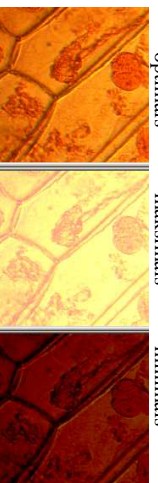


- Pīkseļu skaits.
- Attēla publicēšanai vismaz 600 punkti uz collu.
- Šūnu mērīšanai un skaitīšanai apmēram 150 punkti uz collu.



Spilgtums

- Minimāls spilgtums ir vērojams pie liela optiskā palielinājuma, vāja apgaismojuma, bieža parauga u.c. Spilgtumu palielina, lai:
 - attēls būtu saprotams un drukājams;
 - šūnas/organoīdi būtu saskaitāmi ar datorprogrammas palīdzību.

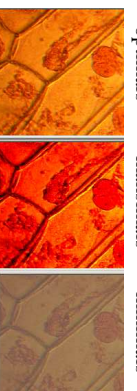
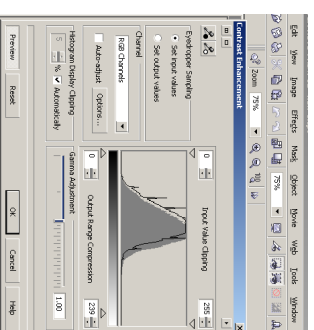


Krāsas un faila lielums

- 512 x 512 punkti, 8-bitu attēls = 262 KB
- 1024 x 1024 punkti, 8-bitu attēls = 1,049 KB
- 1024 x 1024 punkti, 12-bitu attēls = 1,573 KB
- 2048 x 2048 punkti, 16-bitu attēls = 8,389 KB

Kontrasts

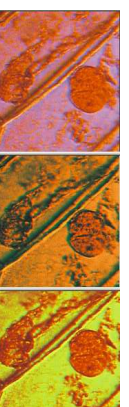
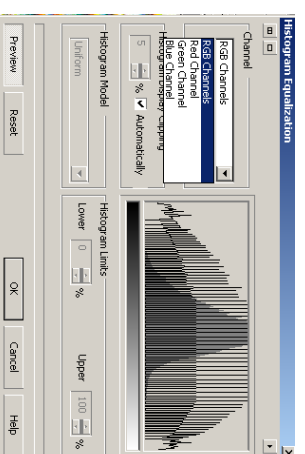
- Minimāls kontrasts pie liela palielinājuma, vāja apgaismojuma, bieža parauga u.c.
- Kontrastu palielina, lai:
 - attēls būtu saprotams un drukājams;
 - šūna/organoīdi būtu saskaitāmi ar datorprogrammas palīdzību.



Krāsas

- Iespējami 1, 4, 8, 16, 24 un 32 bitu attēli.
- Tas nozīmē, ka ir redzami 2¹, 2², 2³, 2⁴, 2⁸, attiecīgi krāsas toni.
- Iespējami 3 krāsu kanāli. Tādējādi var iegūt: 2⁸ x 2⁸ x 2⁸ = 16,777.216 krāsas tonus.
- Labākas fotoiekārtas piedāvā 24 bitu krāsu dziļumu.
- Parasti ir 16 biti vai mazāk.

Krāsas

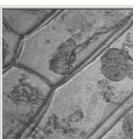
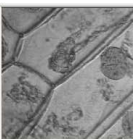
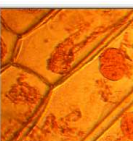


zilsais kanāls sarkanais kanāls zaļais kanāls

Mērīšanai un publicēšanai izmanto pelēko krāsu skalu.

Cilvēka ādas parasi var uzlīvert 300 tonnus starp absolūti baltu un absolūti melnu.

Postsovietiskas tipogrāfijas darbinieki nemēdz nodrošināt pelēko krāsu skalu, piemēram, attēli centrālizrētajos eksāmenos u.c.



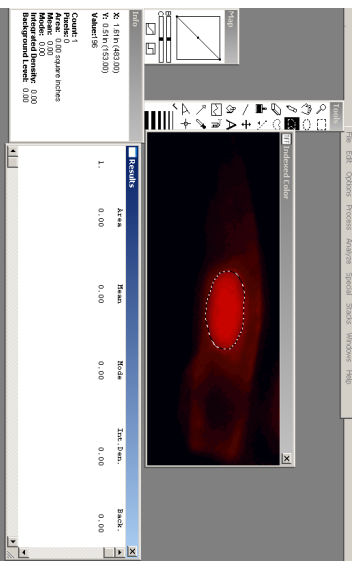
16 milj. tonņi

256 tonņi

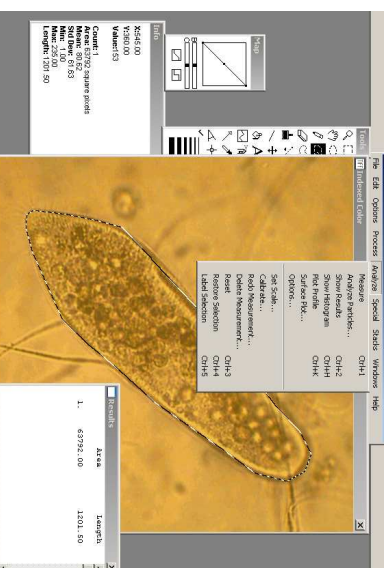
16 tonņi

2 tonņi

Šūnu un organoīdu blīvuma mērīšana



Šūnu un organoīdu izmēru mērīšana



Šūnu un organoīdu kustības ātruma mērīšana



Konfokālais lāzerskenējošais mikroskops un tā sagatavošana darbam

Konfokāla skenējošā galva

Stareniskais digitālais luminescences mikroskops



Lāzera ieslēgšanas atslēga

Lāzera bloks

Leica DM RA-2 mikroskops ar konfokālo skenējošo galvu TCS-SL (Leica Microsystems, Bannockburn, Ill).

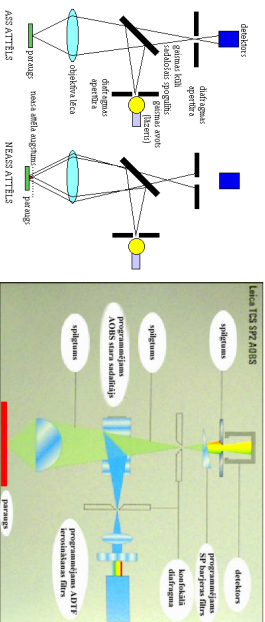
Gaismas avots

Argona lāzeris, viļņu garums 458 nm, 476 nm, 488 nm, 514 nm, 533 nm.

Hēlija-Neona lāzeris, viļņu garums 633 nm



Optiskā shēma

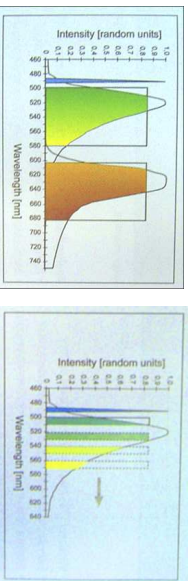


Stara sadalītājs

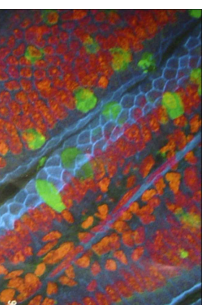
AOBS ļauj precīzi sadalīt dažāda viļņu garuma emitēto gaismu.
Nav pārtraukumu līknē.

Prizmas spektrofometrs

- Ļauj mērit un regulēt emitētās gaismas diapazonu.
- Var atšķirt līknes, kuru emisijas maksimumi atšķiras tikai par 5 nm.
- Nodrošina paralelu skenēšanu 4 kanāliem.



Izmantojamās krāsas



Fluo cells (Molecular Probes). Zila: Phalloidin actin, Alexa Fluor 568.
Zaļa: Mucus of goblet cells, Alexa Fluor 350.
Sarkana: Nucleic acid stain, Sytox Green.

Lāzeru un filtru izvēle. Fluorohromu izvēle preparātu analīzei

- Lāzerus izvēlas, atbilstoši izmantojamajam fluoroforam (viela, kura no gaismas uzņemto enerģiju izstaro ar zemāku viļņa garumu).
- Filtrus (emisijas) izvēlas, atbilstoši izmantojamajam fluoroforam .

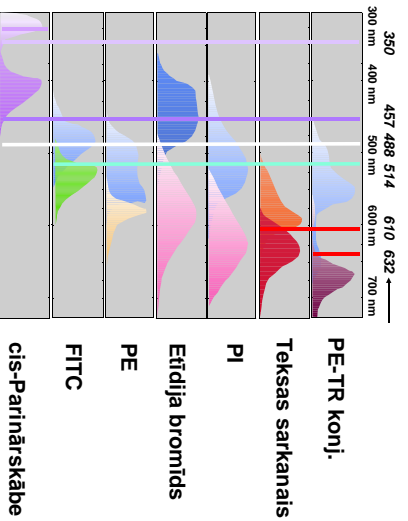
Sagatavojot darbam:

- Ieslēdz mikroskopu.
- Ieslēdz lāzeru bloku.
- Ieslēdz He-Ne un Ar lāzerus.

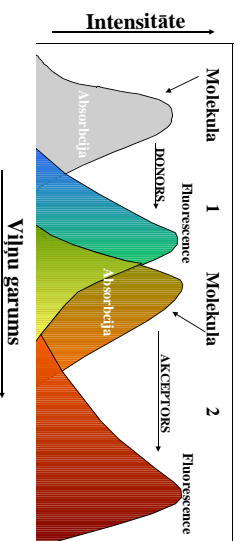
Darbu beidzot:

- Izslēdz lāzerus.
- Izslēdz mikroskopu.
- Dzesē lāzerbloku 10 min.
- Izslēdz lāzerbloku.

Tipiskākie krāsvielu ierosināšanas diapazoni



Fluorohromu absorbcija un emisija



Fluoroforu piemēri proteīnu izmēšanai

ierosināšana	emisija	lāzera līnija
FITC	488	488
Texas Red™	610	633
Tetramethylrhodamine-amines	550	533
CY3 (indotrimethineyanines)	540	533
CY5 (indopentamethineyanines)	640	633

Fluoroforu piemēri DNS izmēšanai

ierosināšana	emisija	lāzera līnija
YOYO-1	491	509
Acridine Orange (RNA)	460	650
Acridine Orange (DNA)	502	536
Ethidium Bromide	526	604
PI (uv/vis)	536	620
7-Aminoactinomycin D (7AAD)	555	655

pH un oksidatīvie indikatori

ierosināšana	emisija	lāzera līnija
SNARF-1	488	575
BCECF	488	525/620
DCFH-DA	488	525
HE	488	590
DHR 123	488	525

Fluorohromu piemēri organelļu izmēšanai

Probe	Site	Excitation	Emission
BODIPY	Golgi	505	511
NBD	Golgi	488	525
DPH	Lipid	350	420
TMA-DPH	Lipid	350	420
Rhodamine 123	Mitochondria	488	525
DiO	Lipid	488	500
diI-Cn-(5)	Lipid	550	565
diO-Cn-(3)	Lipid	488	500

BODIPY - boron-dipyrromethene complexes

NBD - nitrobenzoxadiazole

DPH - diphenylhexatriene

TMA - trimethylammonium

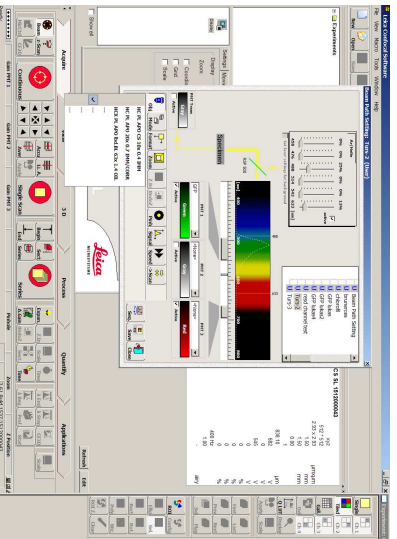
Fluorescentie proteīni

<http://www.microscopy.com/articles/fluorescing/fluoro.html>

Protein (Acronym)	Excitation Max (nm)	Emission Max (nm)	Molar Extinction Coefficient	Quantum Yield	Structure	Relative Brightness (% of GFP)
GFP (wt)	395-415	509	21,000	0.77	Monomer*	48
Green Fluorescent Proteins						
EYFP	484	507	56,000	0.60	Monomer*	100
AcGFP	480	505	50,000	0.55	Monomer*	82
TurboGFP	482	502	70,000	0.53	Monomer*	110
Emerald	487	509	57,500	0.68	Monomer*	116
Azami Green	482	505	55,000	0.74	Monomer	121
ZsGreen	493	505	43,000	0.91	Tetramer	117
Cyan Fluorescent Proteins						
ECFP	439	476	32,500	0.40	Monomer*	39
mCFP	433	475	32,500	0.40	Monomer	39
Cerulean	433	475	43,000	0.62	Monomer*	79
Opf1	435	477	35,000	0.51	Monomer*	53
AmCyan1	458	489	44,000	0.24	Tetramer	31
Midoriishi1 Cyan	472	495	27,300	0.90	Dimer	73

Konfokālā lāzerskenējošā mikroskopa preparātu attēli un to aberācijas

- **Aksnālā izšķirtspēja:**
Pa Z-asi jāpārbauda redzes lauka fluorescences intensitāte pie 50 %.
- **Redzes lauka plakanums:**
Visā redzes laukā nepieciešams vienāds assums, pretējā gadījumā Z-ass informācija būs neprecīza. Izņemums ir augu lapas u.c., sakarā ar dažāda biezuma paraugu.
- **Hromatiskās aberācijas:**
Pārbauda vai visā redzes laukā emisija ir konstanta, t.i., nav novērojama radiāla vai tangenciāla intensitāte, kas veidojas no objektīvu lēcu hromatiskās aberācijas.
- **Z-ass precizitāte:** pārbauda vai visā redzes laukā Z-ass mērījumi parāda vienādu rezultātu, mikrometra desmitdaļas atšķirības 50 mikrometru biezā paraugā uzskatāma par lielu kļūdu.



Fluorescentie proteīni

<http://www.microscopy.com/articles/fluorescing/fluoro.html>

Yellow Fluorescent Proteins						
EYFP	514	527	83,400	0.81	Monomer*	151
Topaz	514	527	94,500	0.80	Monomer*	169
Venus	515	528	92,200	0.57	Monomer*	156
mCherry	516	529	77,000	0.76	Monomer	174
YPet	517	530	104,000	0.77	Monomer*	238
PhYFP	525	537	124,000	0.39	Monomer*	144
ZsYellow1	529	539	20,200	0.42	Tetramer	25
mBarnes	540	553	6,000	0.7	Monomer	13
Orange and Red Fluorescent Proteins						
Kusabira Orange	548	559	57,600	0.80	Monomer	92
mOrange	548	562	71,000	0.89	Monomer	146
dTomato	554	581	69,000	0.89	Dimer	142
dTomato Tandem	554	581	138,000	0.89	Monomer	283
DsRed	558	583	75,000	0.79	Tetramer	176

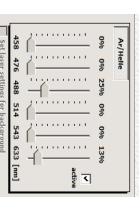
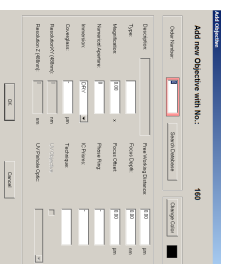
Programmodrošinājums konfokālajā lāzerskenējošajā mikroskopijā un tā izmantošana attēlu un videomateriālu rediģēšanai un mērījumu iegūšanai



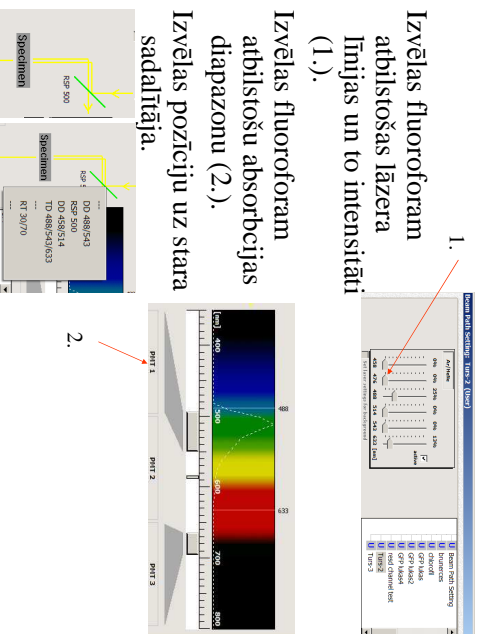
LEICA

Šajā sadaļā jūs tiksiet iepazīstināti ar Leikas datoprogrammām, jo tās izmanto mūsu lāzerskenējošais mikroskops.

- Izvēlas atbilstošu objektīvu



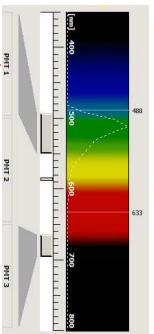
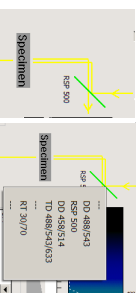
HC PL APO CS 10x 0.4 1HM
HC PL APO CS 07 1HM/COR
HC PL APO DUAL CS 1.4 0IL



Izvēlas fluoroforam atbilstošās lāzera līnijas un to intensitāti (1.).

Izvēlas fluoroforam atbilstošu absorbcijas diapazonu (2.).

Izvēlas pozīciju uz stara sadalītāja.

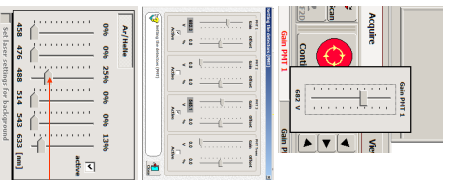


Preparāta ievietošana

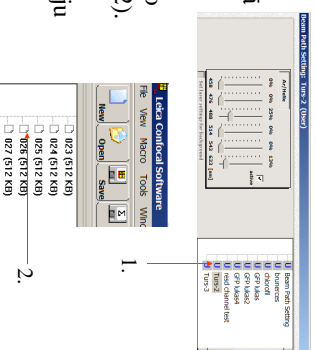
- Novieto priekšmetstiklu uz priekšmetgalda.
- Pacel priekšmetgaldu ar elektronisko skrūvi (2.) vai ar makroskrūvi (3.).
- Iestāda priekšmetgalda 0 robežu (1.).
- Gaismas filtru (4.) iestāda pozīcijā 3.
- Ieslēdz caurejošo gaismu (5.) un, griežot makroskrūvi, makroskopā atrod meklējamo objektu.



- Ja nepieciešams pastiprināt signālu, uz monitora regulē funkciju:
- b) "Gain",
 - c) pastiprina lāzera jaudu.
- Vēlams, lai diafragmas (pinhole) atvēruma nepārsniegtu 1 mikrometru.

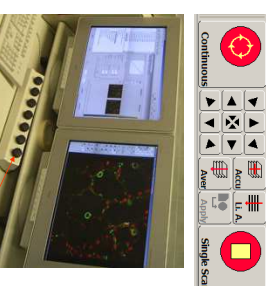


- Var izmantot iepriekšējo eksperimenta uzstādījumus (1.).
 - Var izmantot iepriekšējo paraugu uzstādījumus (2.).
- Aver datu bāzi, aktivē attēlu, un izvēlas funkciju "Apply".



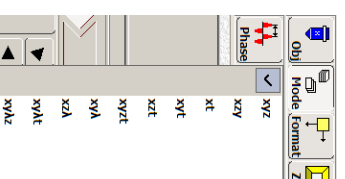
Aktivē funkciju "Continuous".

Griež mikroskopa makroskrūvi vai ar bultīņu norādīto Z-ass regulācijas slēdzi un atrod meklējamo objektu.



Izvēlas attēla iegūšanai nepieciešamās asis.

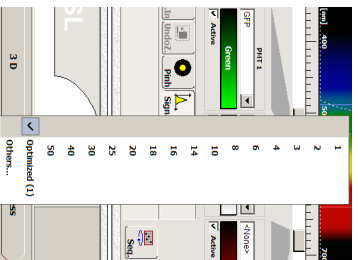
Fotografēšana



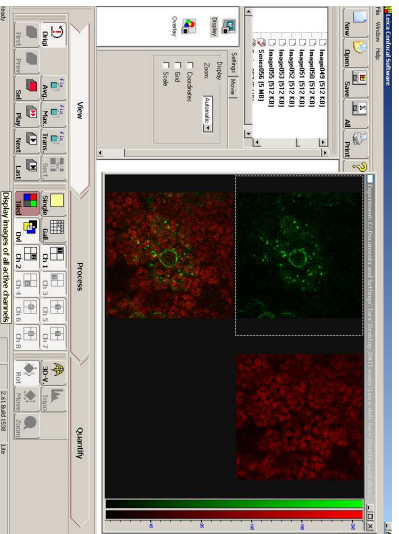
Izvēlas funkciju
 “Aver” vai
 “Accu” un
 iestāda
 vēlamo
 skenēšanas
 reīžu skaitu
 fotogrāfijas
 iegūšanai.



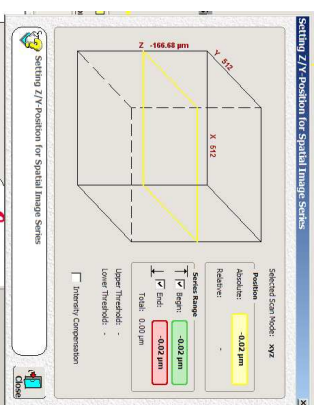
- Izvēlas griezummu skenējamo attēlu skaitu.



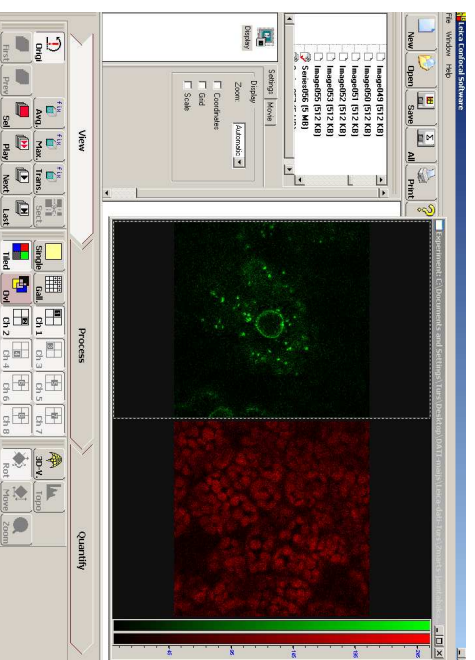
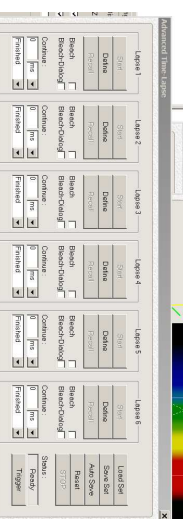
Datu apstrāde ar LCS Lite. Kanāli un to apvienošana

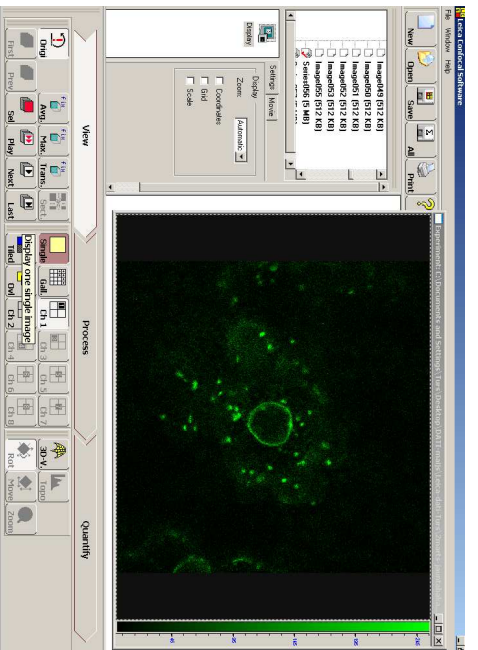


**3D attāla iegūšana
 (skenēšana pa xyz
 asi)**
 Nepieciešams
 skenēt attēlus
 izvēlētajā parauga
 biezumā.
 Ar mikroskopa
 palīdzību izvēlas
 skenēšanas
 sākuma un beigu
 punktu.

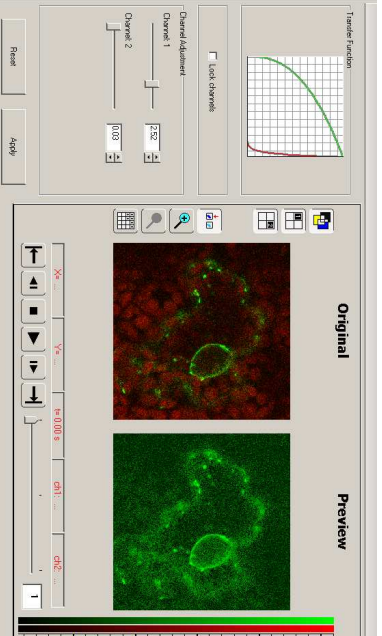
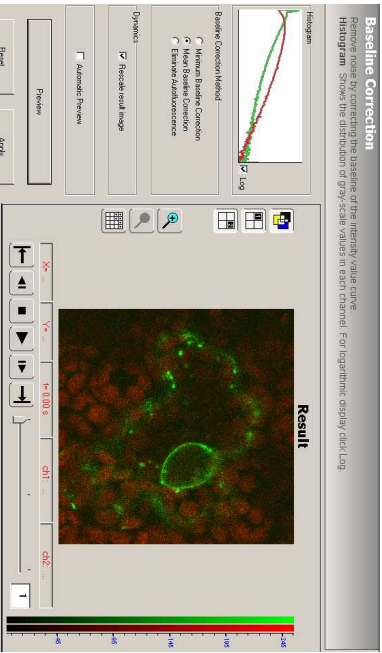
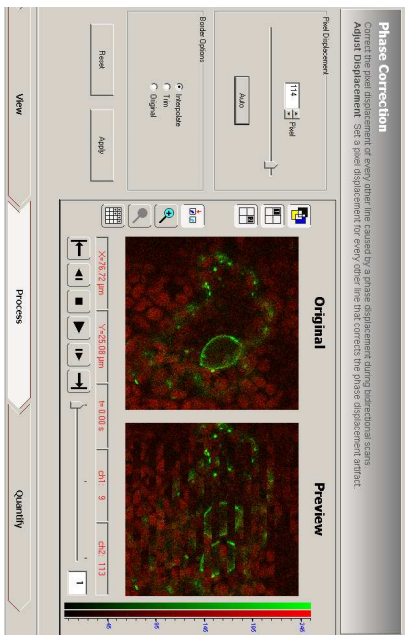
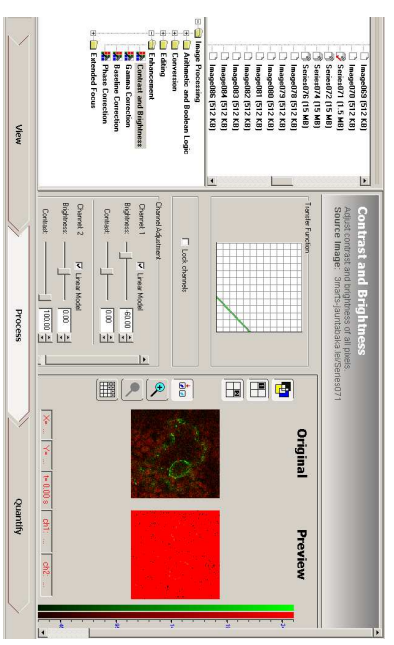
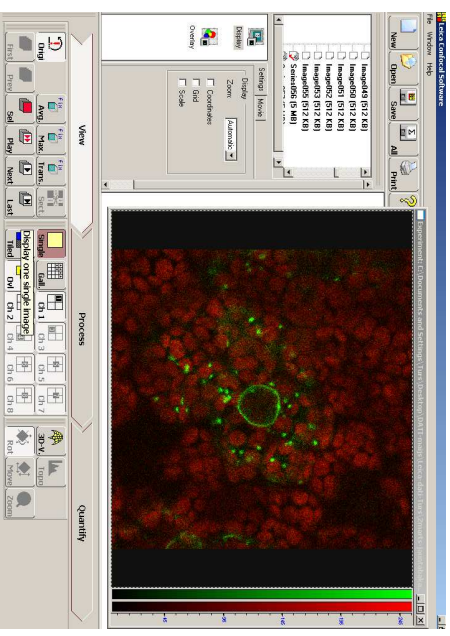


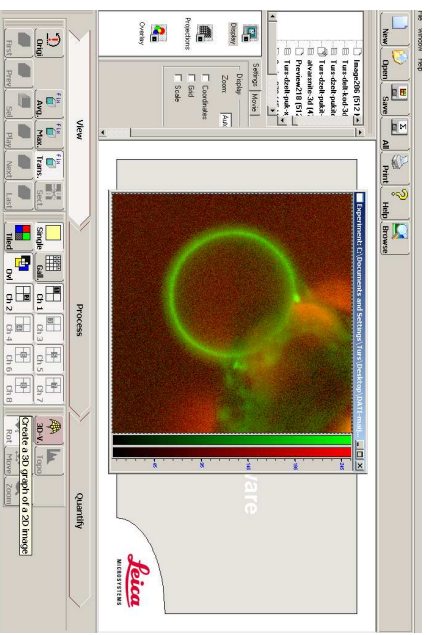
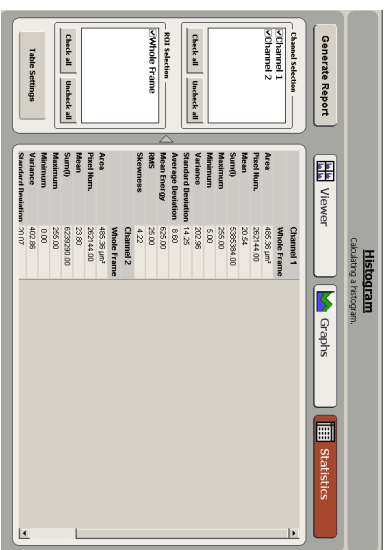
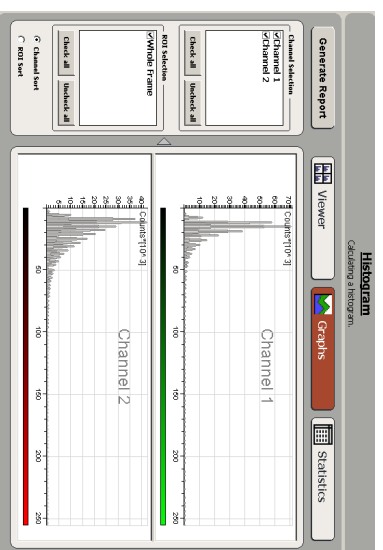
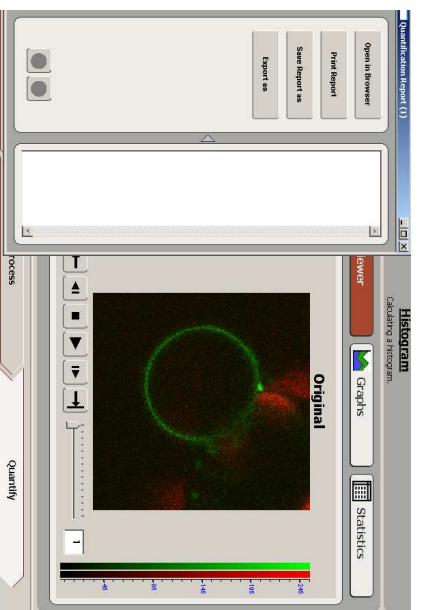
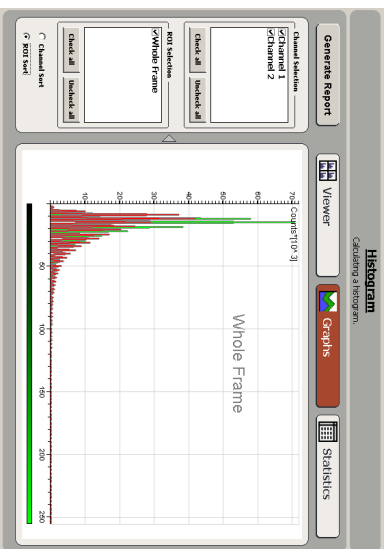
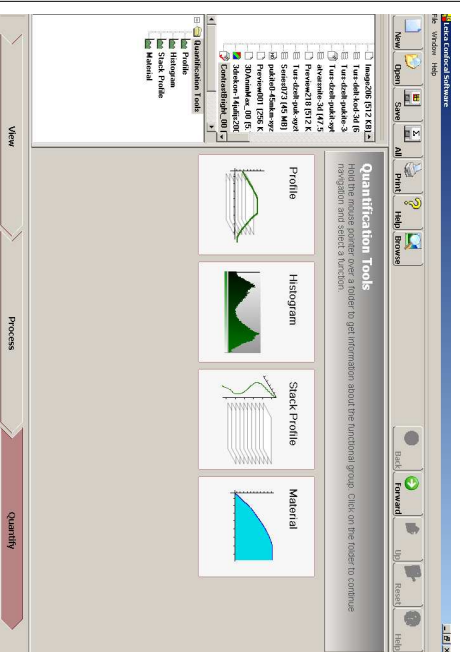
- Skenēšana pa xyt vai xytz asi.
- Izvēlas skenēšanas laika ilgumu un intervālu starp reīzēm. Nevar filmēt reālā laikā!

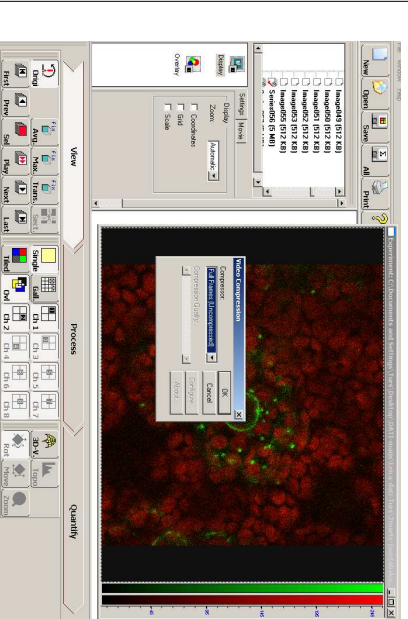
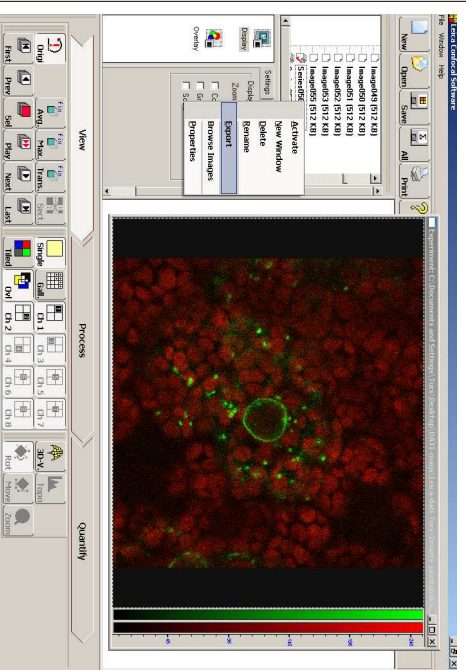




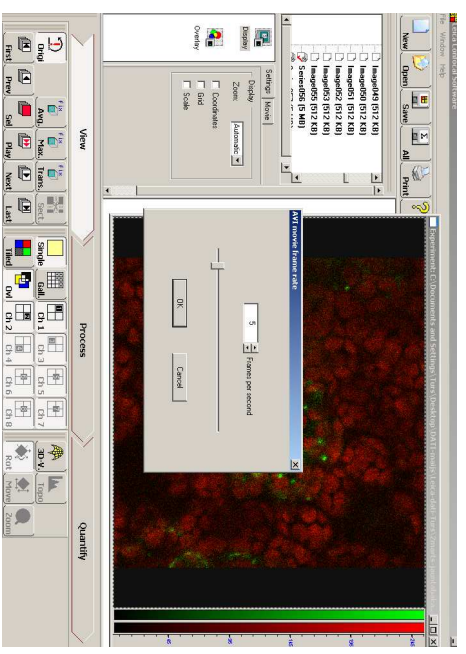
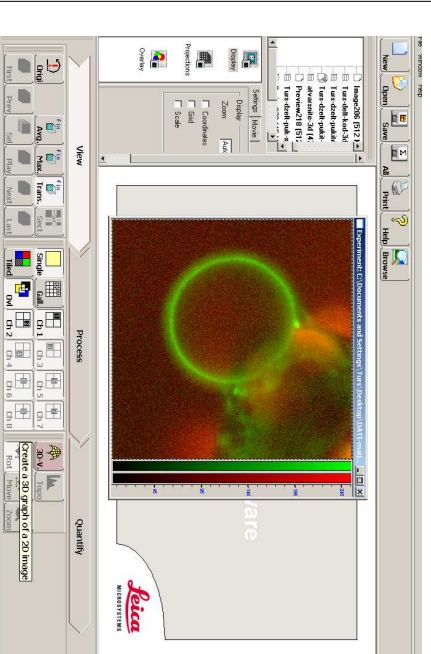
Video







Video



3D rekonstrukcija

- Video-1
- Video-2
- Video-3
- Video-4

Seminārs "Videomikroskopija un konfokālā lāzerskanējošā mikroskopija".

Prezentē rediģētu:

- a) videofilmu;
- b) animāciju;
- c) 3D rekonstrukciju.