

Лекция 2

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия (ЛСКМ – LSCM)

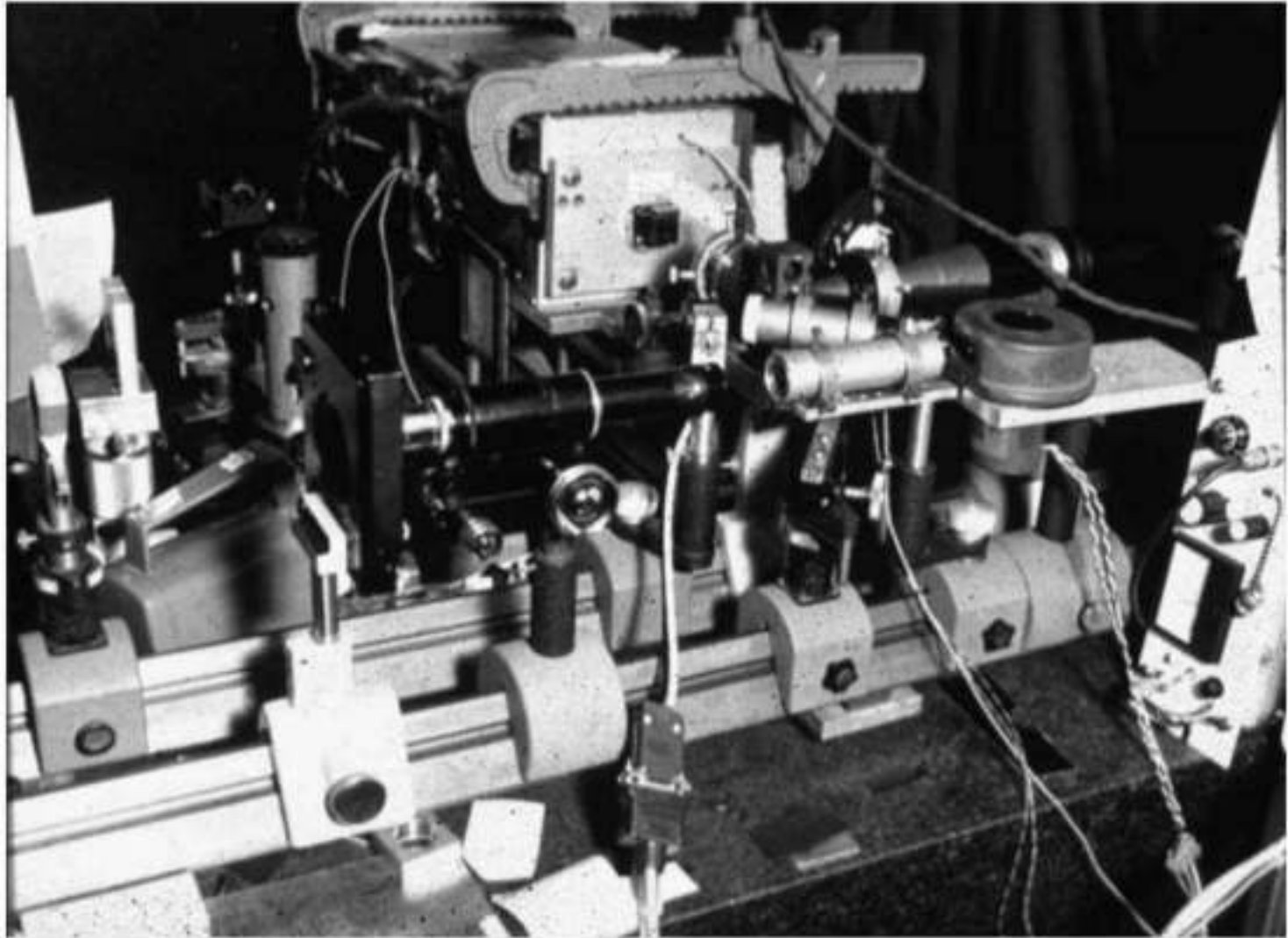
Воробьев Иван Андреевич

Лекция прочитана на ББС МГУ летом 2022 г.

Краткая история

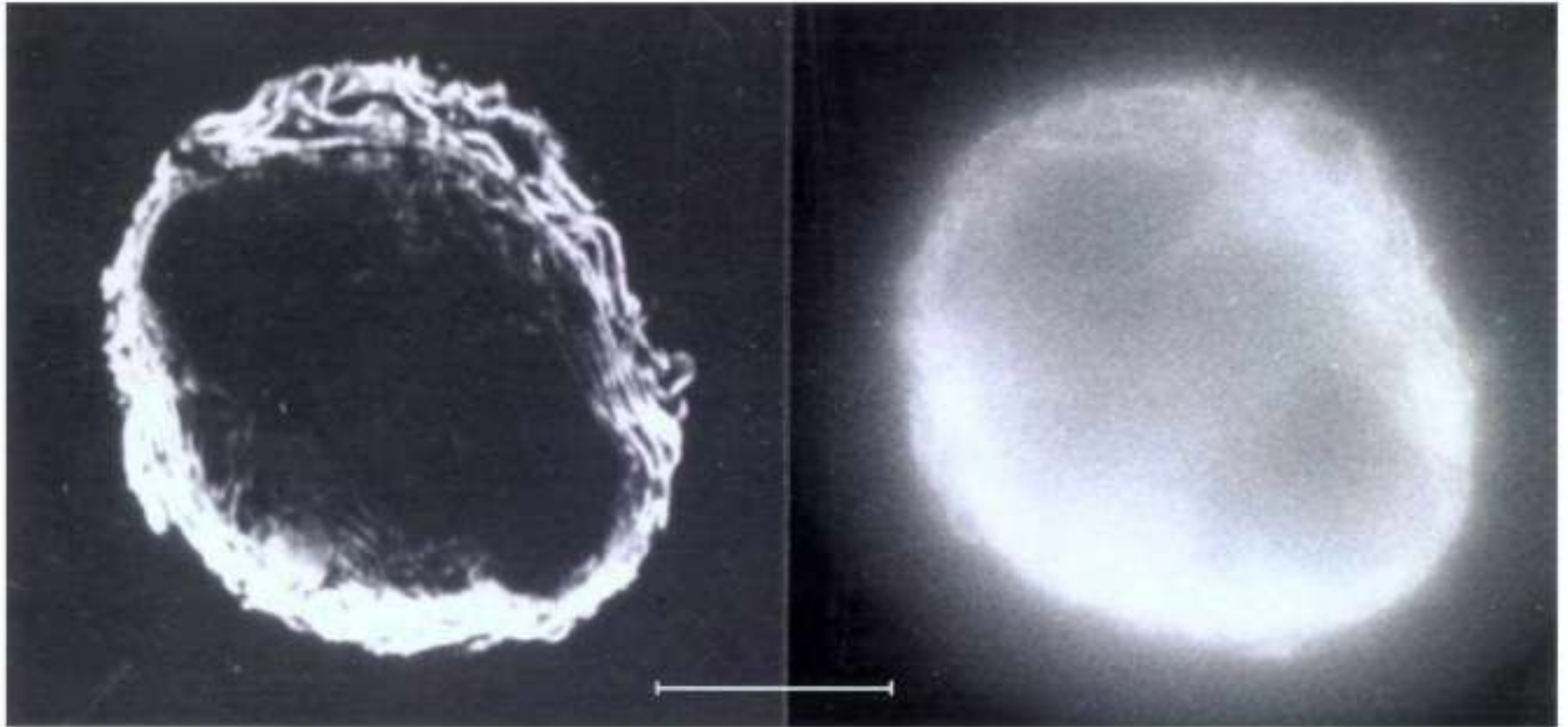
- Первая публикация с рисунком конфокального микроскопа - Zyun Koana (1942). Journal of the Illumination Engineering Institute. 26 (8): 371–385 (по-японски)
- Патент М. Минского (1955, патент подан в 1957, выдан в 1961) – описана схема сканирования препарата перемещением столика, но не было создано работающего образца, и не было картинок и публикаций.
- Тандемный сканирующий микроскоп (изобретен М. Петраном из университета в Пльзене), первая публикация, Science - 1967 – David Egger and Mojmir Petráň, патент выдан в 1970 г.
- Первый лазерный сканирующий конфокальный микроскоп – David Egger и Paul Davidovits (США) 1969 и 1971. Картинки получали с осциллографа, лазерный пучок был неподвижен.
- 1977 – теоретический анализ проблемы и введение термина «конфокальный микроскоп» (С. J. R. Sheppard и А. Choudhury, Оксфорд, Великобритания)
- Середина 80-х - William Bradshaw Amos и 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)

Прототип ЛСКМ, 1986



Оптическая ось микроскопа горизонтальна. Сканирующий окуляр справа.

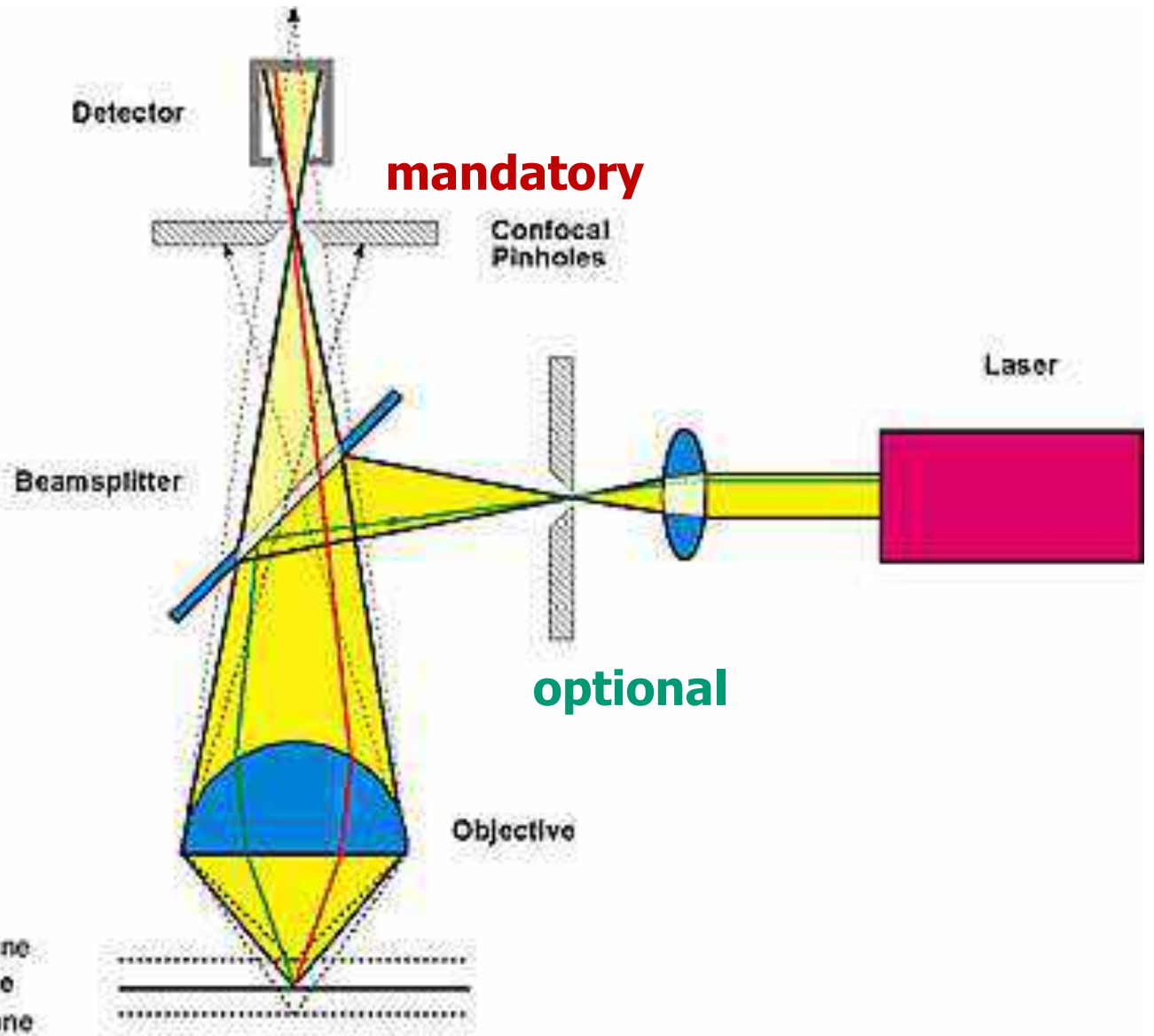
Эпифлуоресценция и конфокальная картины



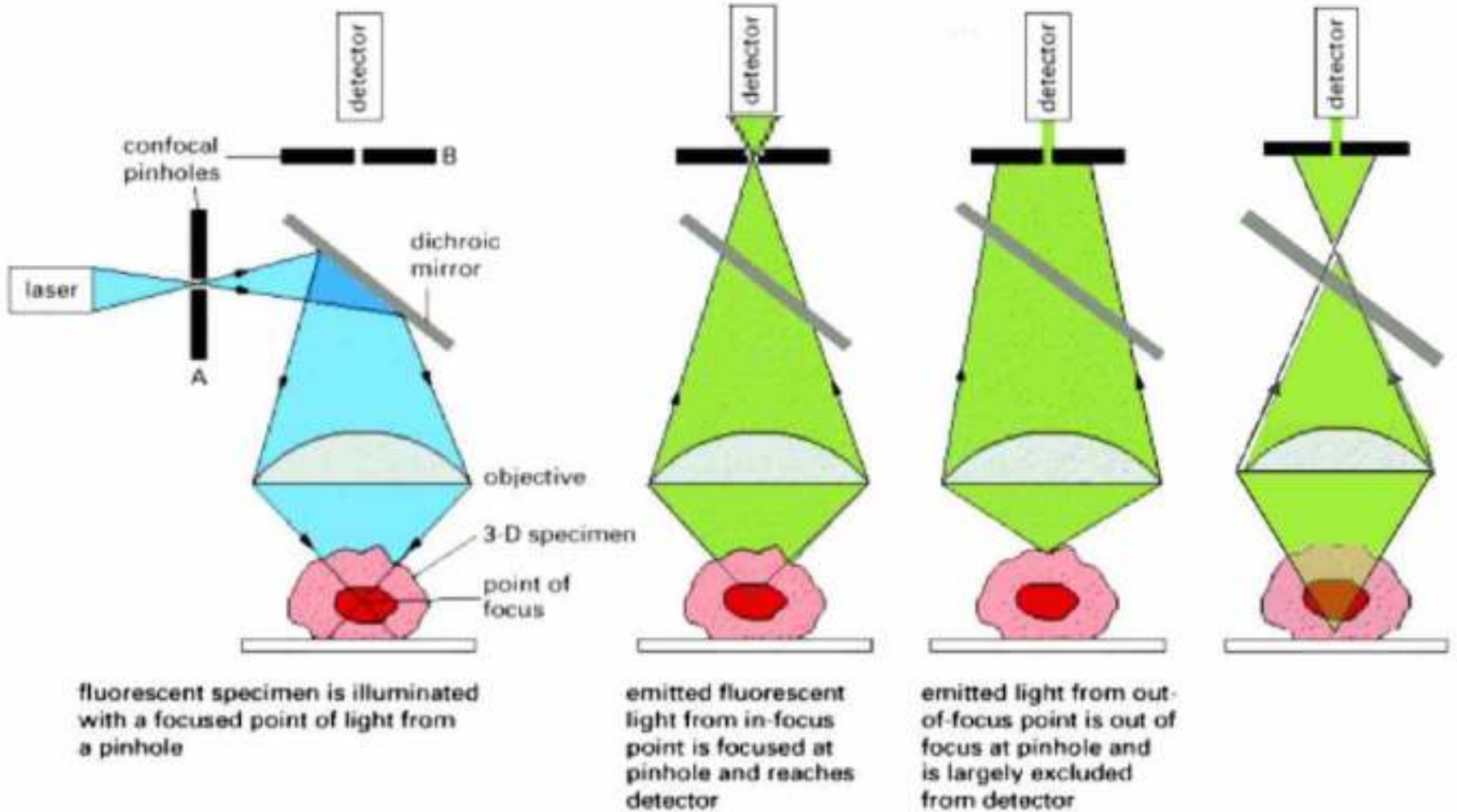
Окраска ЭПР антителами в клетках плазмацитомы.
Шкала 10 мкм. White et al., 1987. J. Cell Biol, 105: 41-48.

Принцип конфокальности

For TEM 00 mode there is no need in the diaphragm in front of the laser beam – only one pinhole in front of the PMT is used.



Принцип устройства



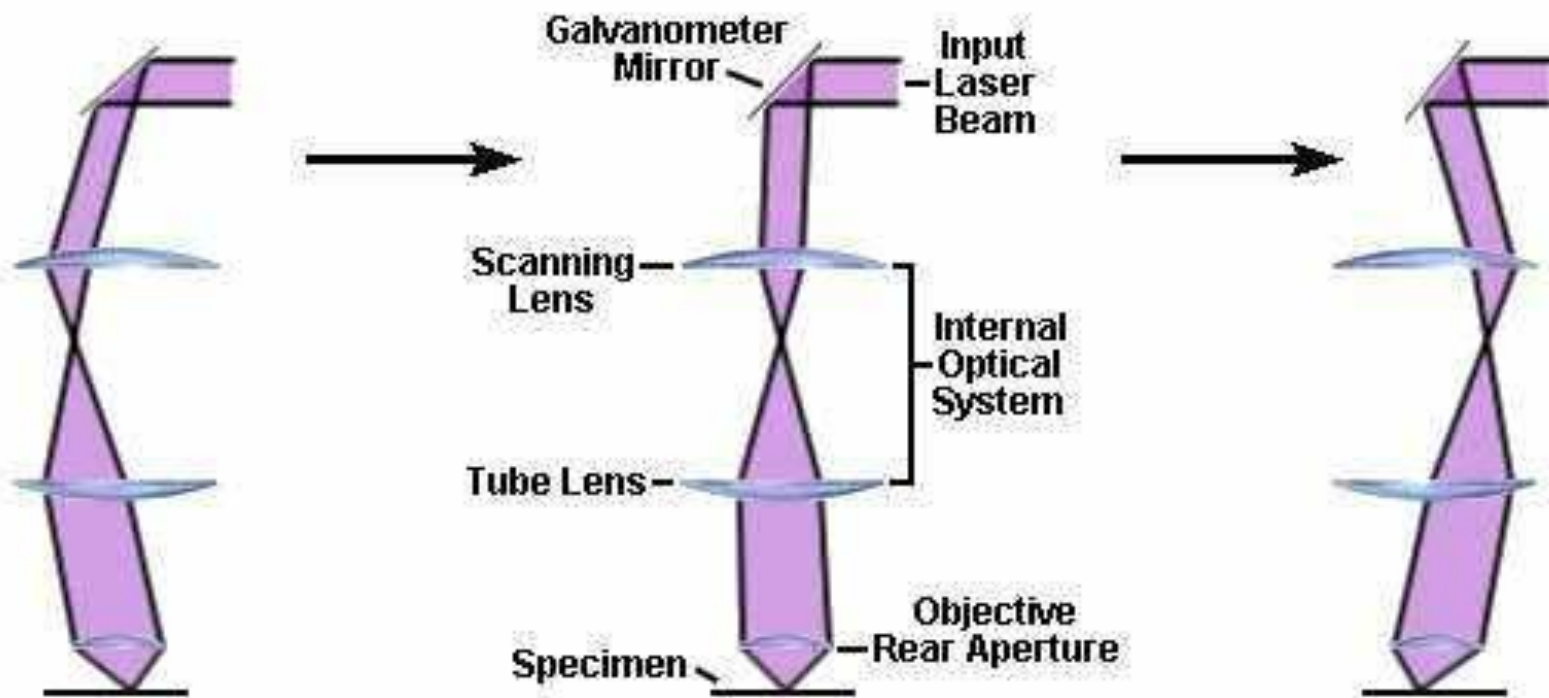
Конфокальный эффект

Для достижения конфокального эффекта большая часть рассеянного света, падающего на детектор, отсекается диафрагмой, поэтому яркость флуоресцентного изображения, находящегося не в фокусе, значительно снижается – получается почти идеальный оптический срез.

Эффект «конфокальности» регулируется в основном за счет размера диафрагмы, стоящей перед детектором. Существенное подавление рассеянного света приводит к некоторому уменьшению сигнала и от областей, находящихся в фокусе.

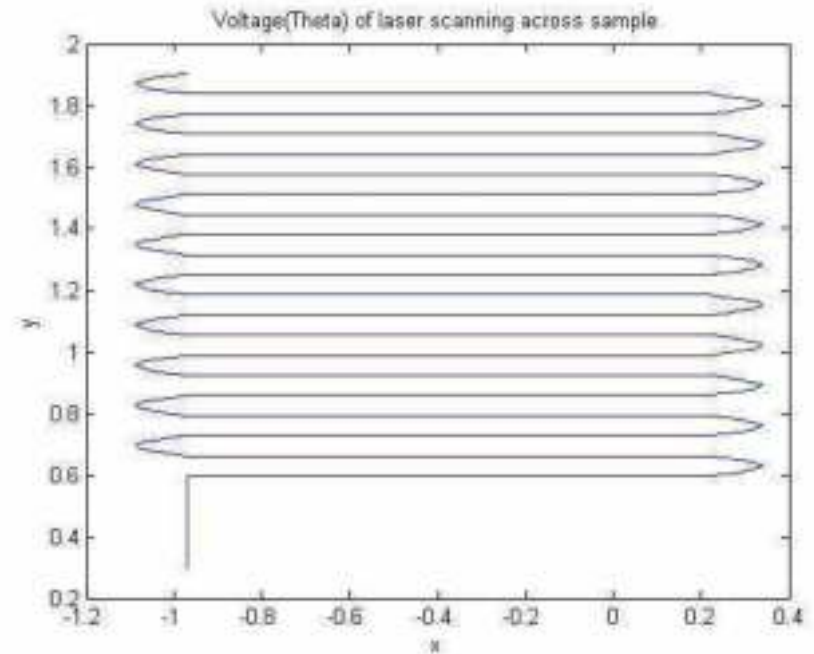
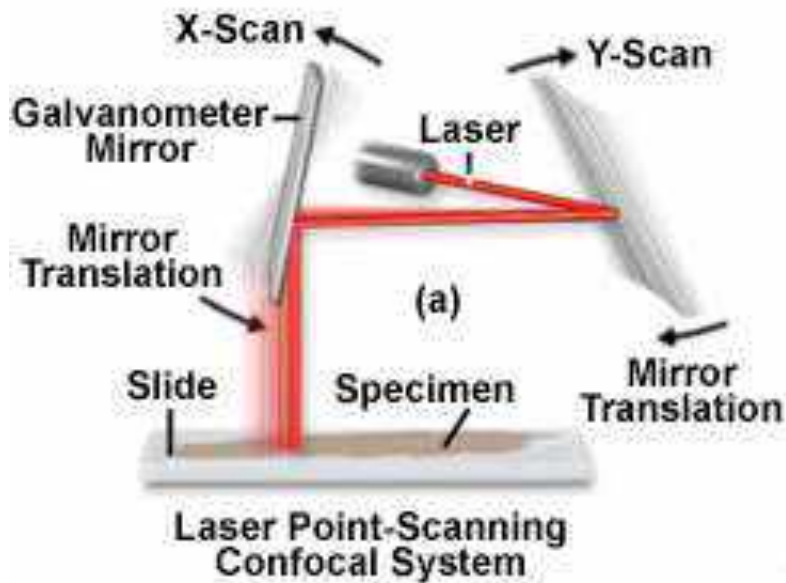
Степень подавления сигнала от несфокусированной части препарата определяется диаметром диафрагмы по отношению к диску Эри, создаваемому объективом.

Развертка луча (сканирование неподвижного образца)



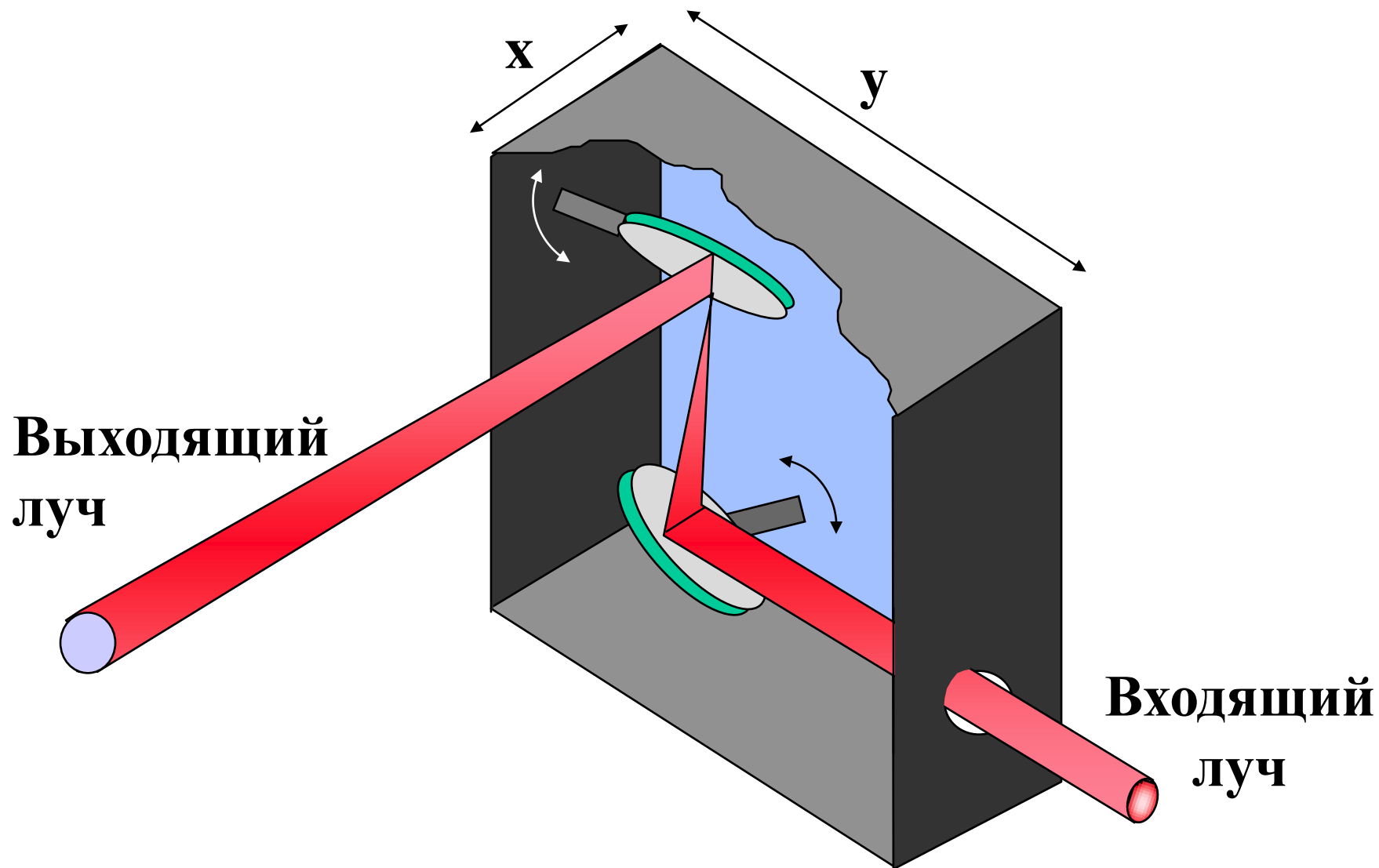
Качающиеся зеркала обеспечивают поточечное сканирование препарата лазерным лучом, сфокусированным через объектив микроскопа.

Принцип лазерного сканирующего конфокального микроскопа

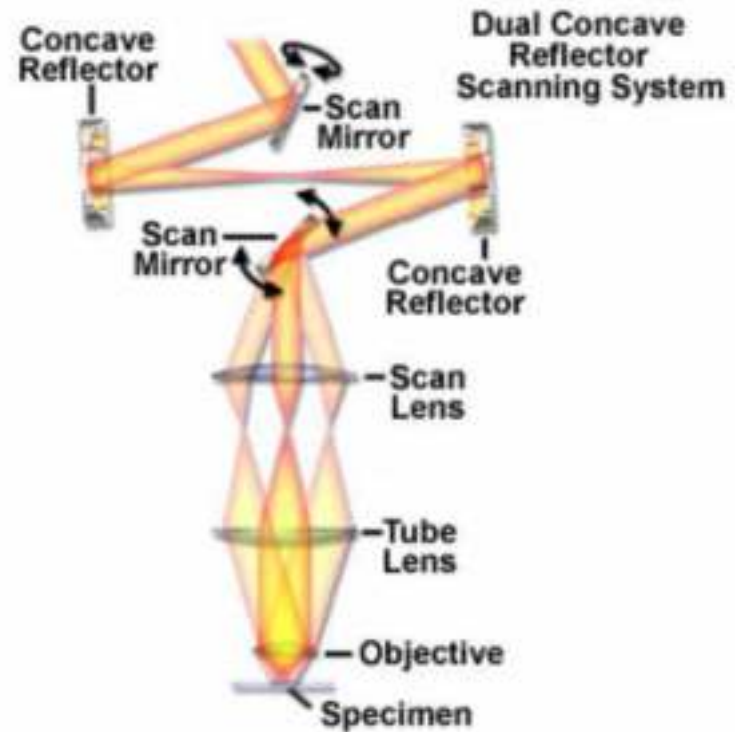
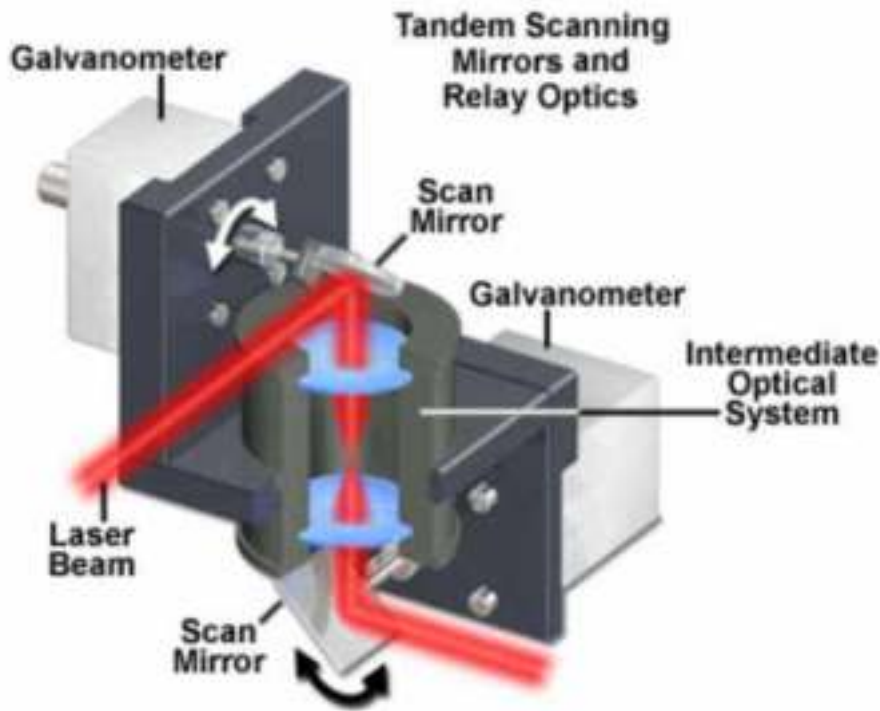


Препарат последовательно сканируется пучком света, проходящим через объектив, и отклоняющимся с помощью двух качающихся зеркал. Частота сканирования задается управляющей системой и составляет несколько тысяч циклов в секунду.

Блок развертки (два управляемых качающихся зеркала)



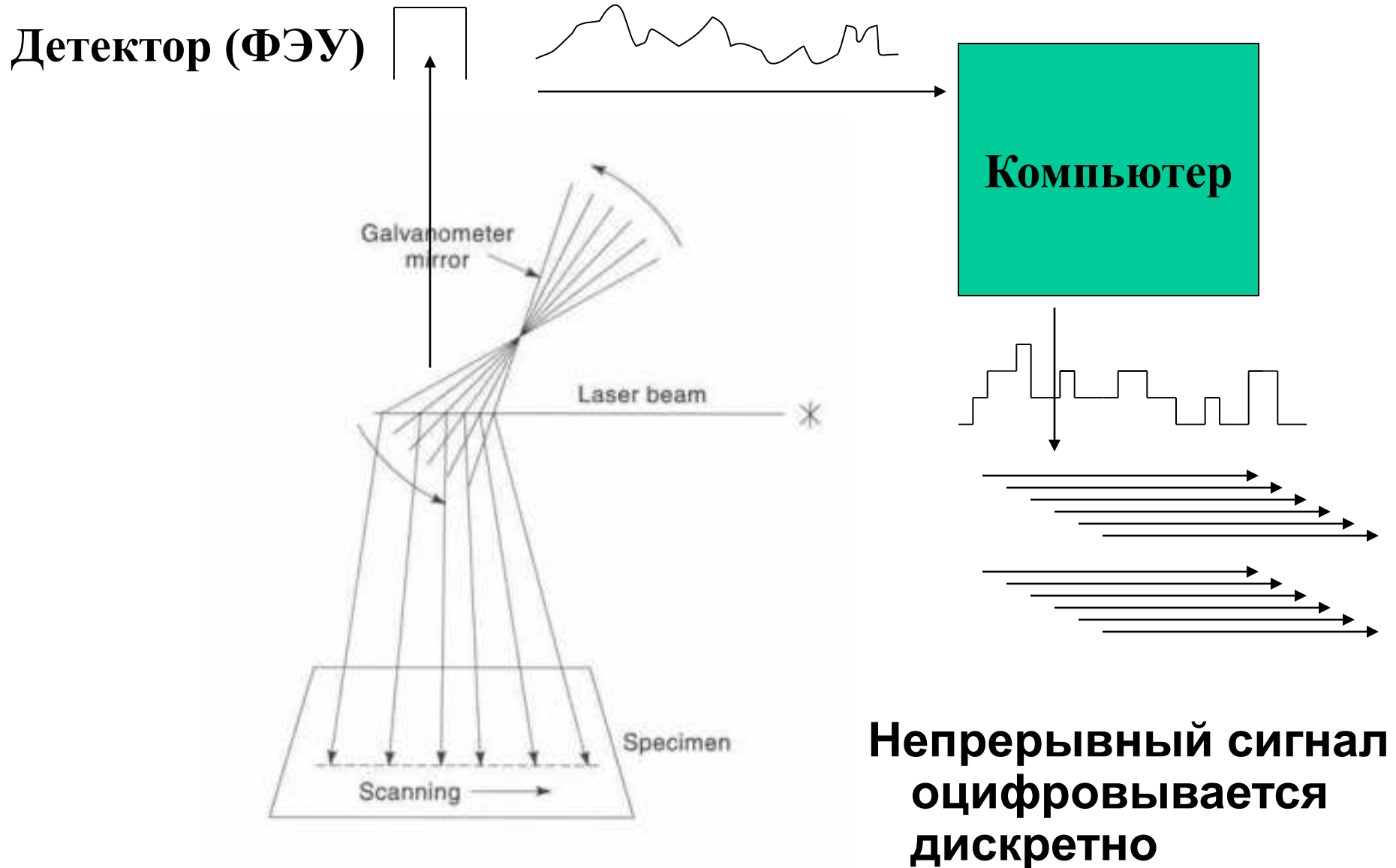
Системы сканирования



Наиболее распространенные устройства сканирования объединяют два сканирующих зеркала с релейной оптической системой (слева). Одновременное перемещение зеркал по перпендикулярным осям создает построчное сканирование образца. Сканирующие зеркала обычно приводят в движение с помощью механизма, аналогичного механизму гальванометра.

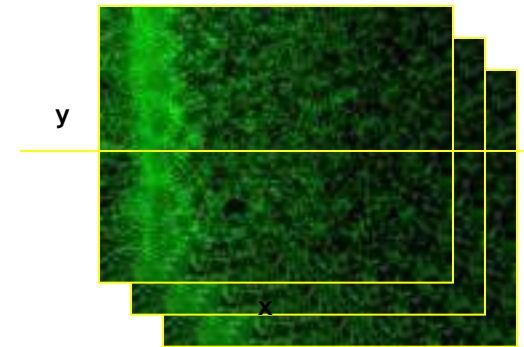
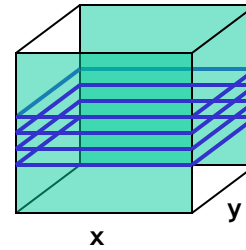
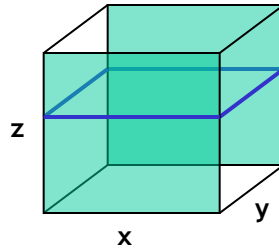
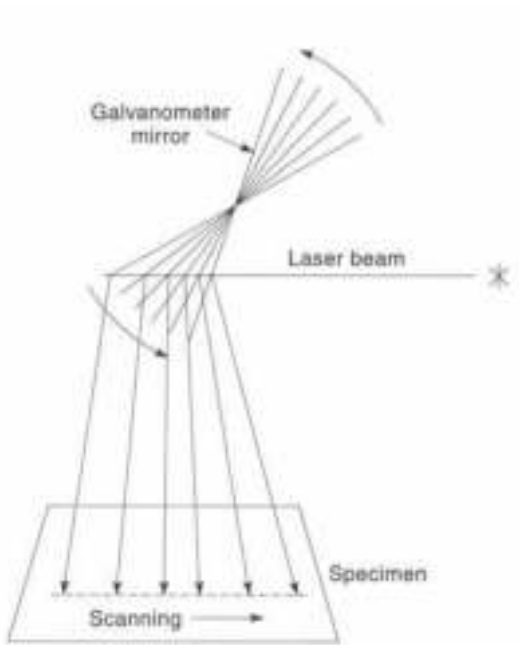
Альтернативная модификация: два внеосевых вогнутых отражателя используются для отображения изображения первого сканирующего зеркала на второе (справа). Зеркала сканирования могут быть небольшими по сравнению с неподвижными зеркалами, что обеспечивает быстрое колебание для высокой частоты кадров.

Сканирование



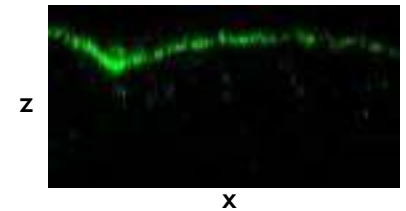
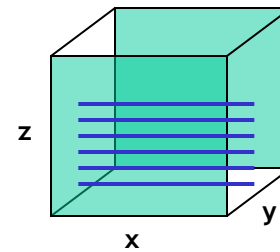
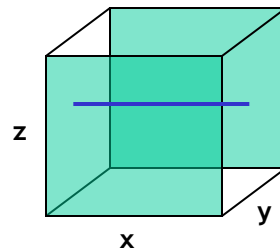
Серийное (послойное) сканирование

xy scanning



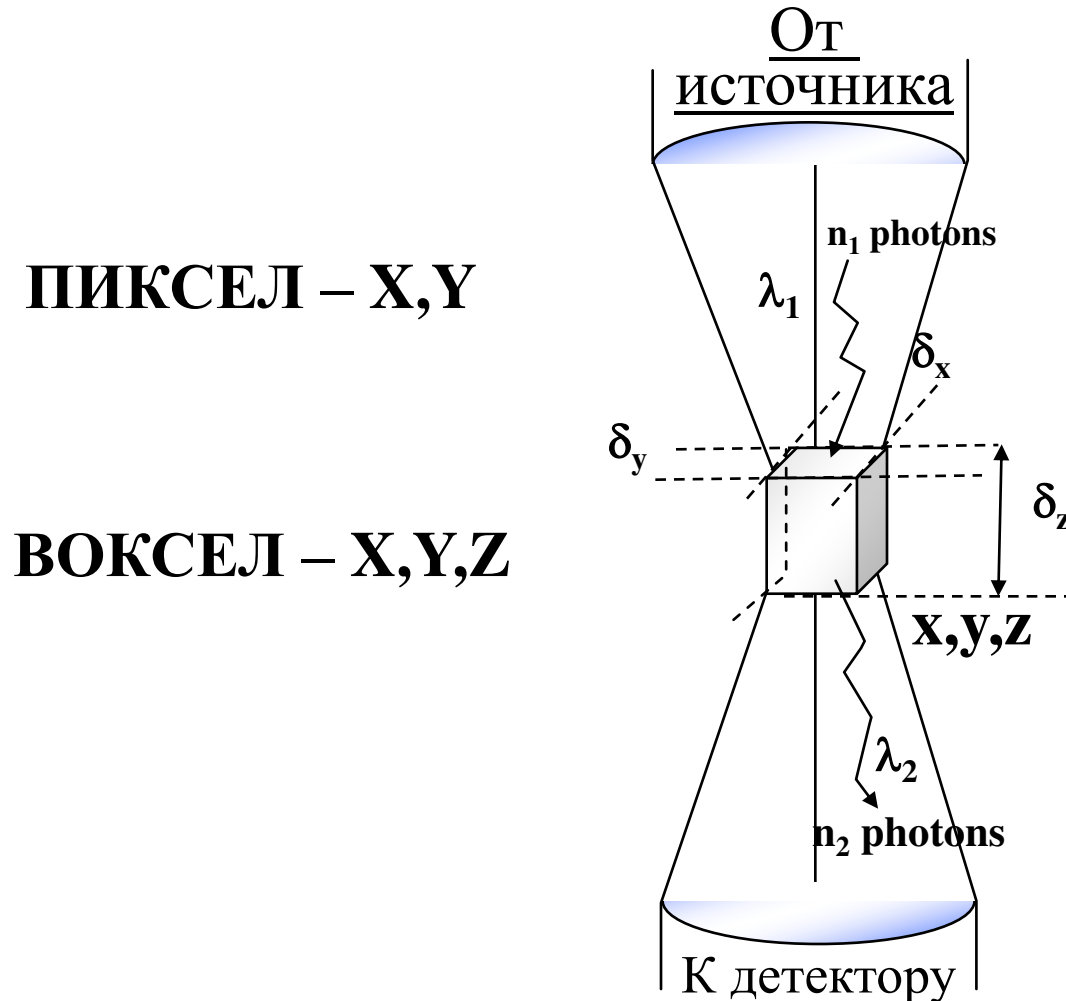
один срез

серия по оси z



xz scanning

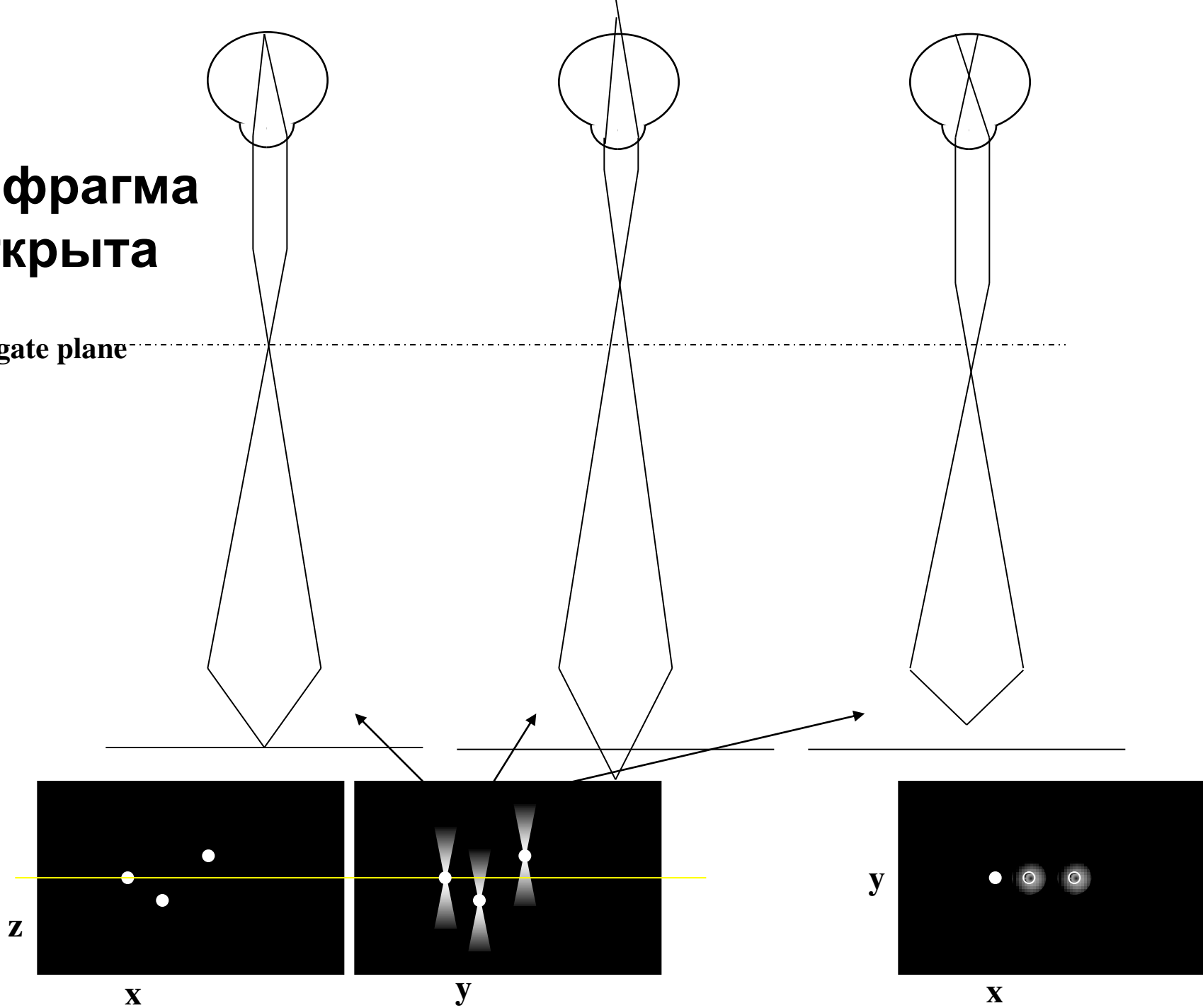
Физические ограничения в конфокальной микроскопии



Минимальный
размер воксела
ограничен
дифракционным
пределом ($\delta_x, \delta_y, \delta_z$)

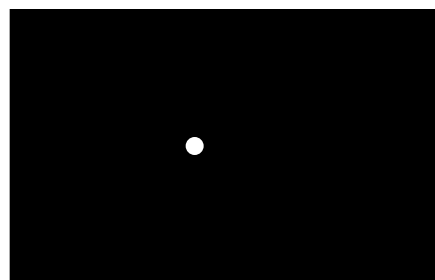
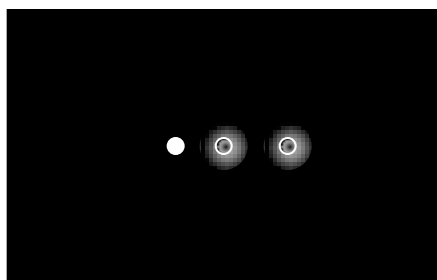
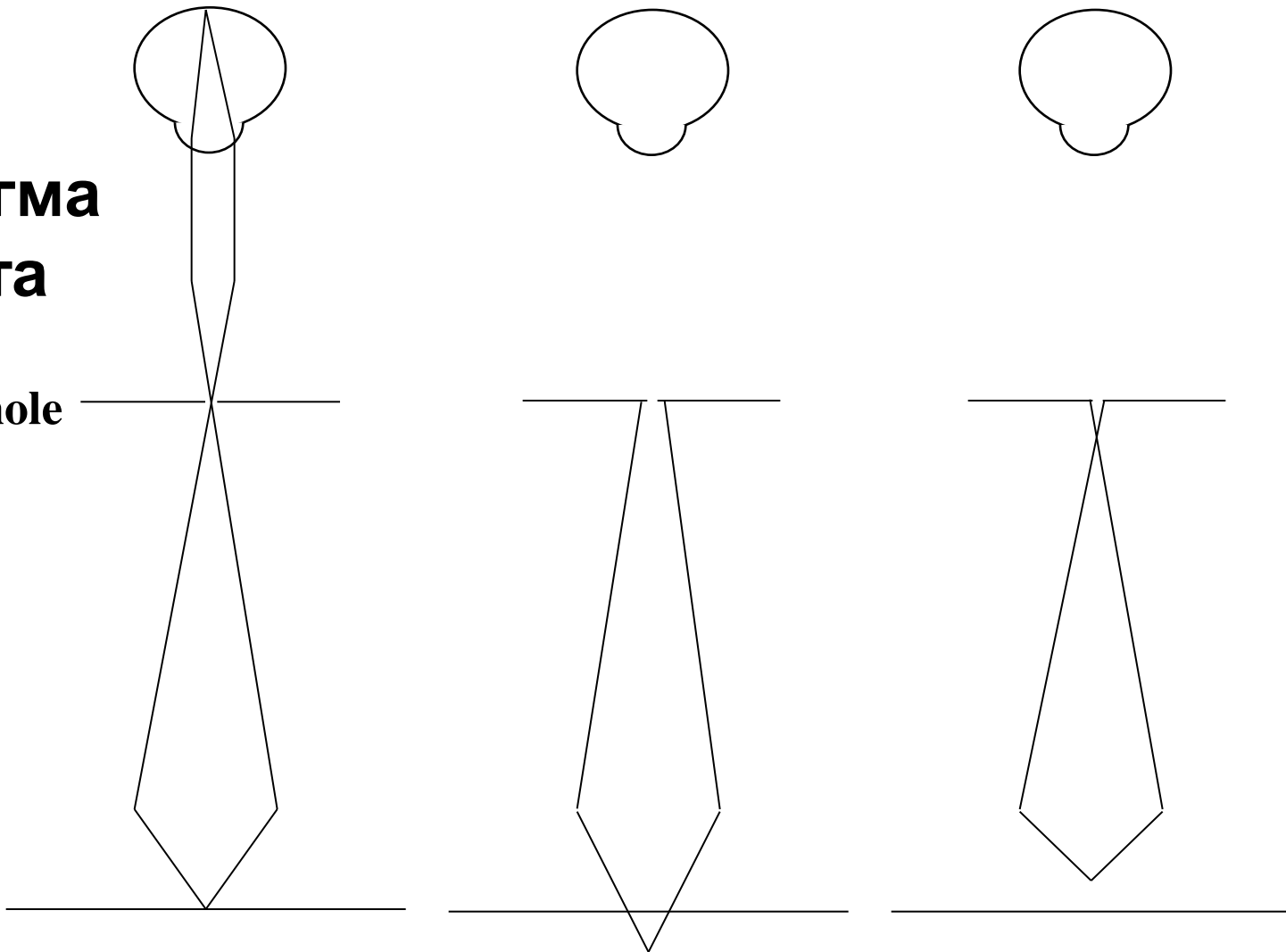
Диафрагма открыта

Conjugate plane



**Диафрагма
закрыта**

Pinhole



Регулировка диафрагмы

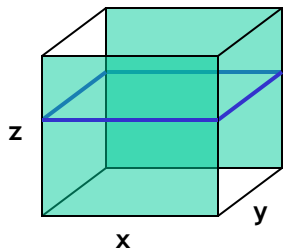
Диск Эри определяется параметрами объектива.
Размер диафрагмы измеряется в дисках Эри (AU).



~0,5 AU – наивысшее качество оптических срезов и наибольшее разрешение. Эффективно удаляется значительная часть сфокусированного света, однако падает отношение сигнал/шум.

1 AU – разрешение в плоскости x-y соответствует обычному микроскопу, но несфокусированный свет сравнительно эффективно удаляется.

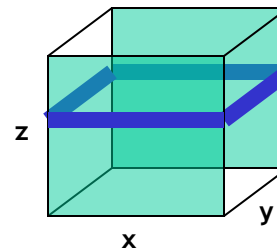
>1,5 AU – собирается больше света, но его значительная часть приходит из областей, расположенных выше и ниже фокуса. Разрешение по оси z существенно ухудшается. Разрешение в плоскости x-y практически не страдает.



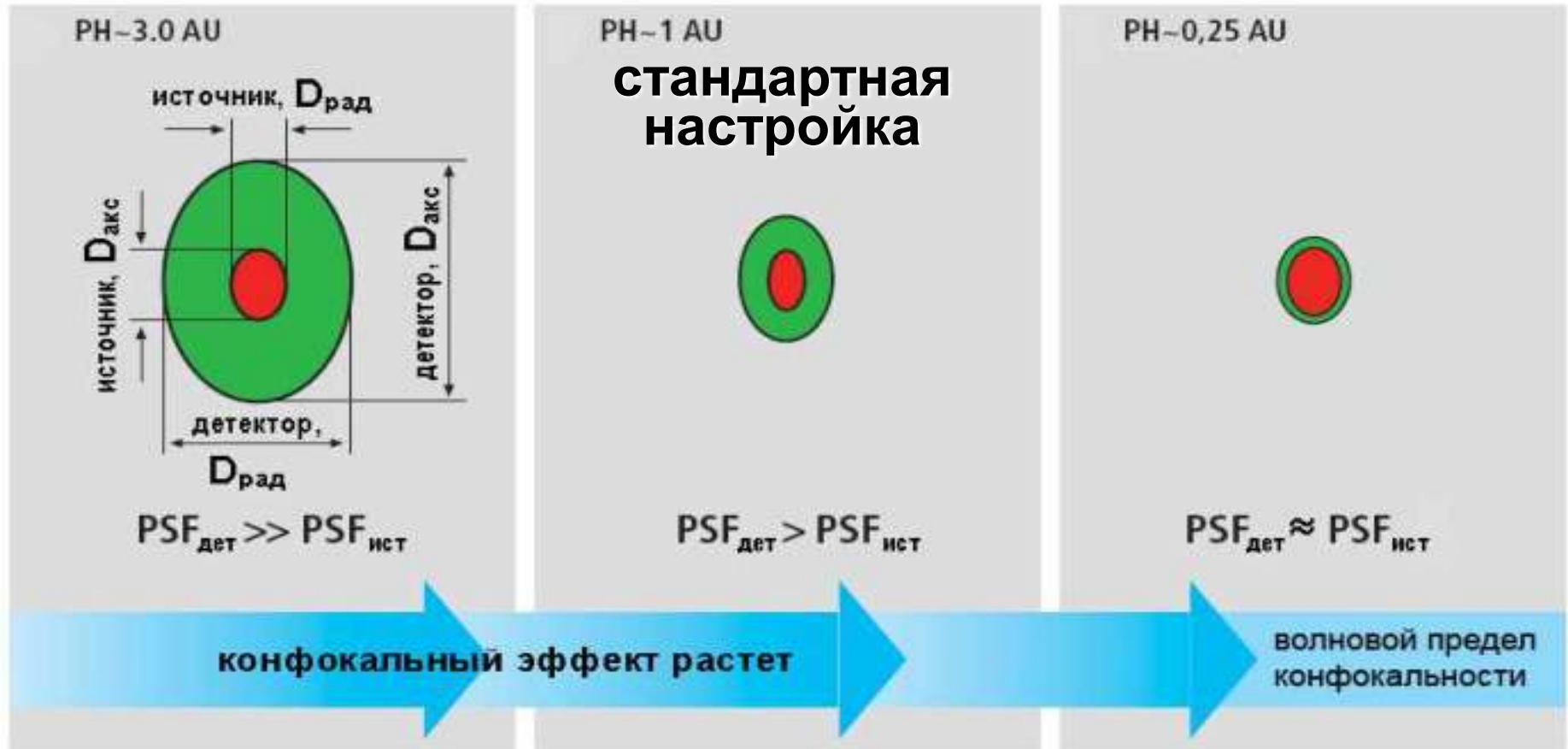
Открытая диафрагма



Закрытая диафрагма

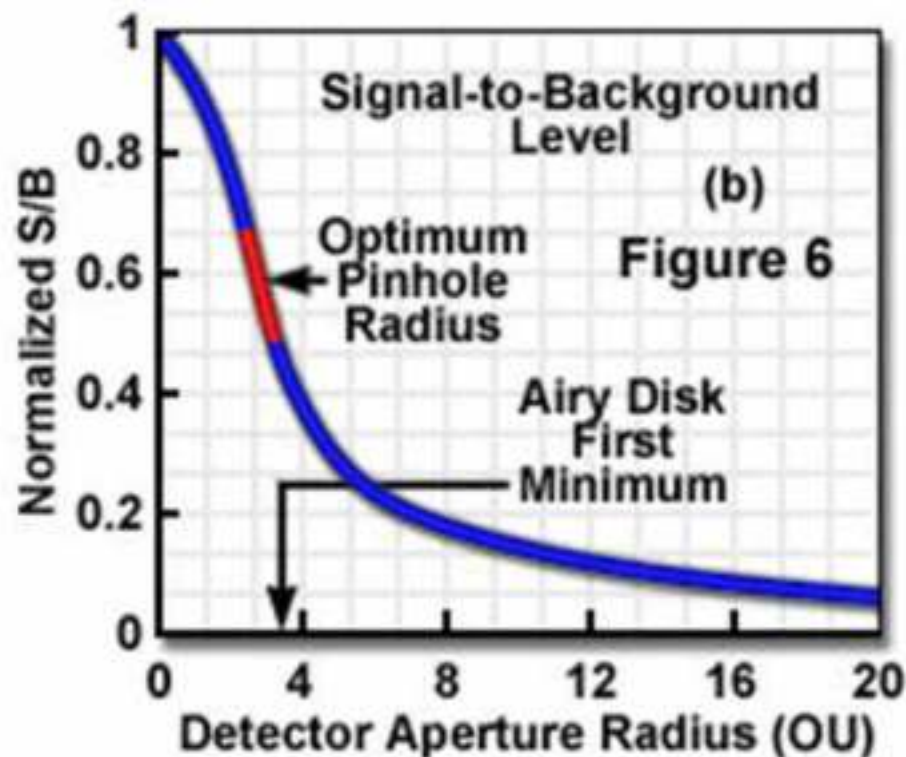
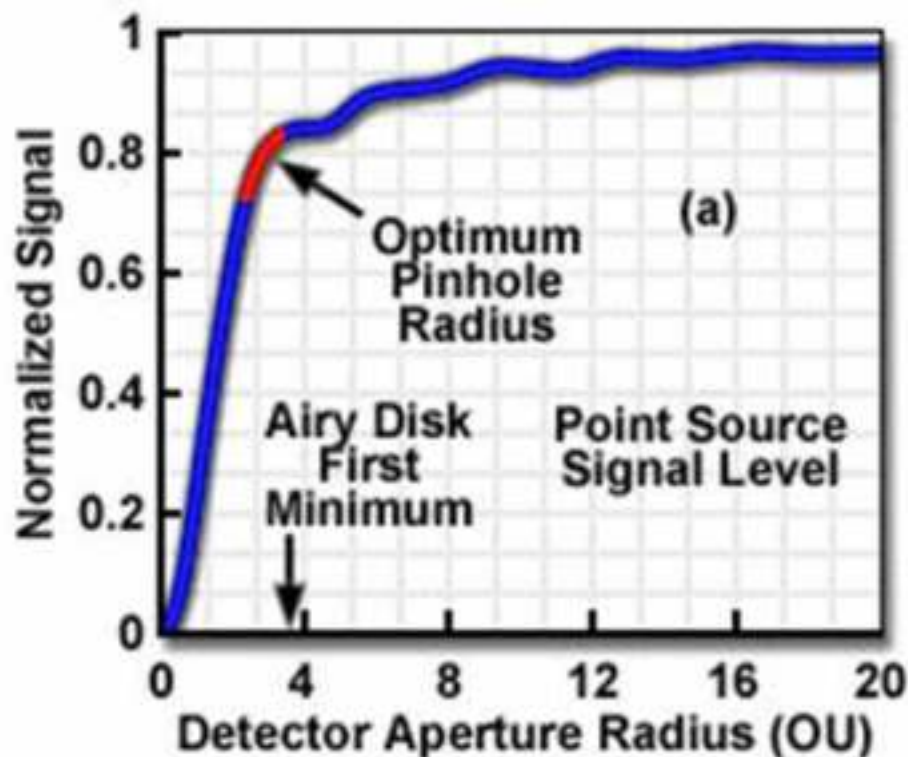


Зависимость конфокального эффекта от размера диафрагмы



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

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.

Общий вид современного конфокального микроскопа



MRC-1024, сканирующая насадка

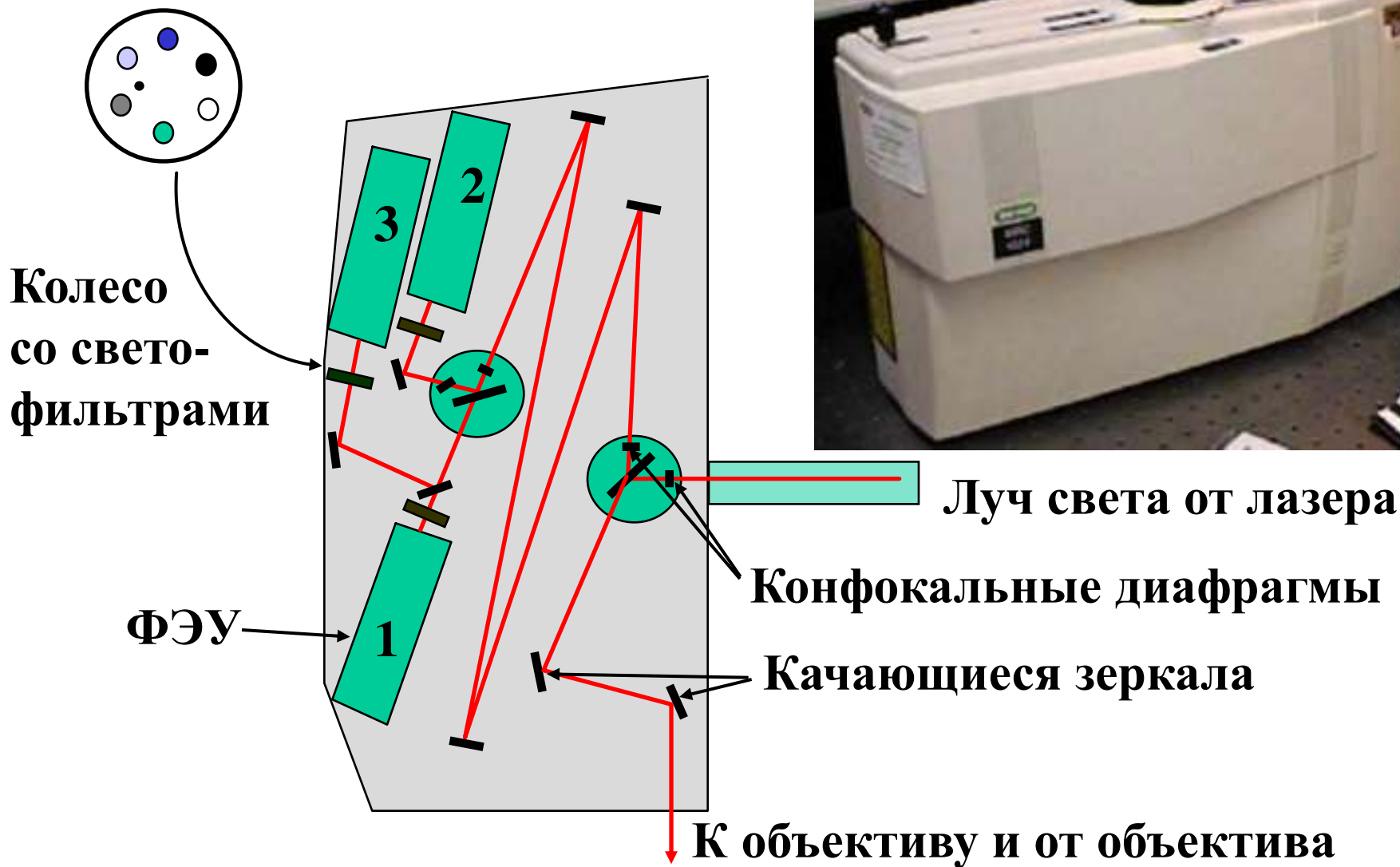
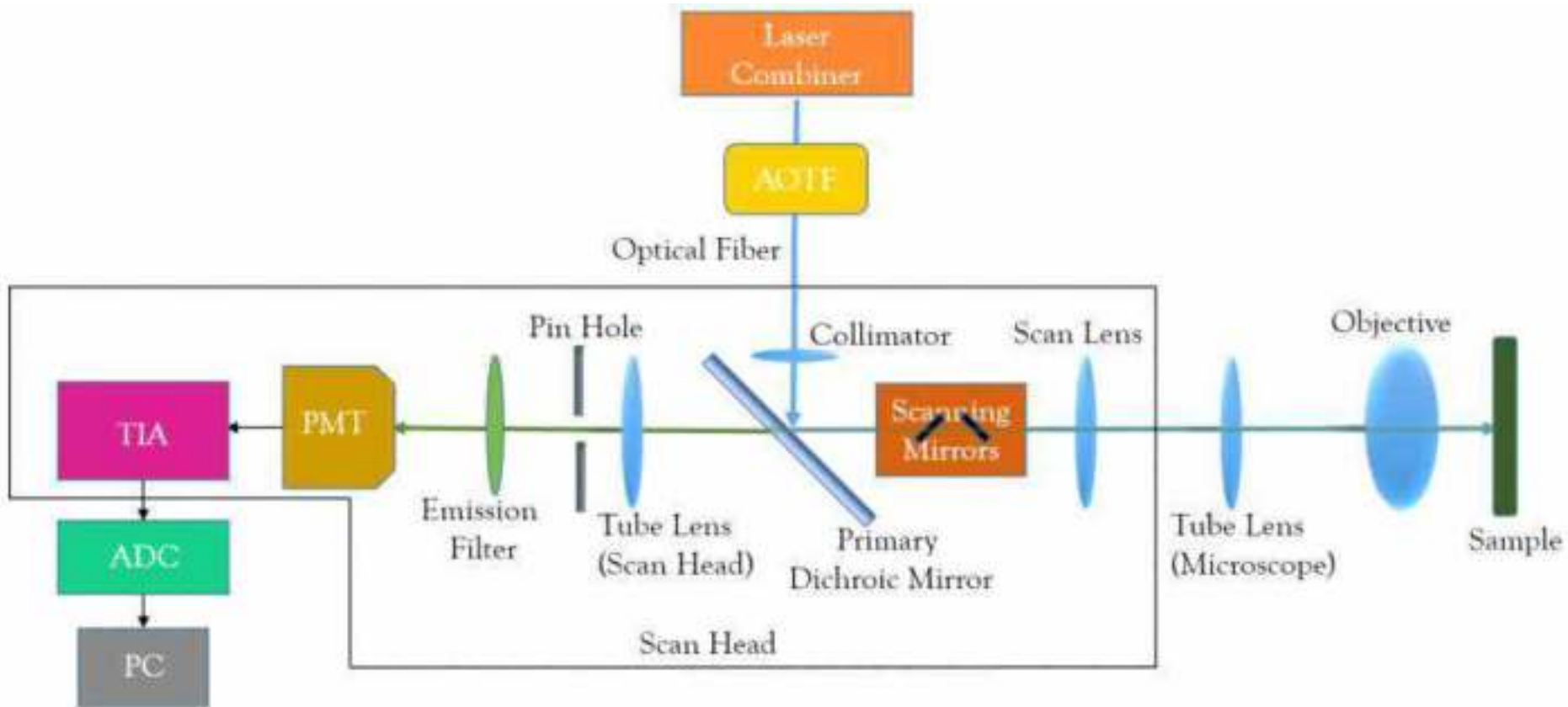
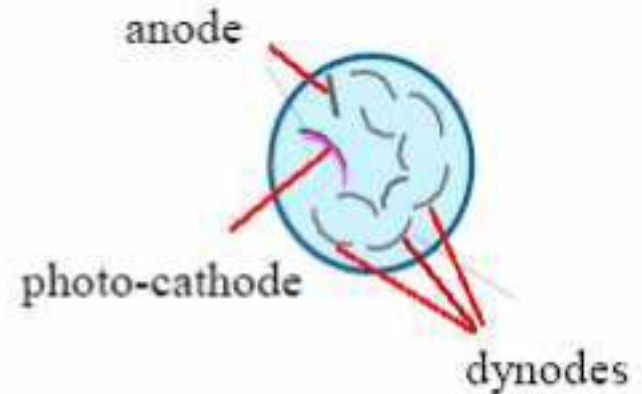
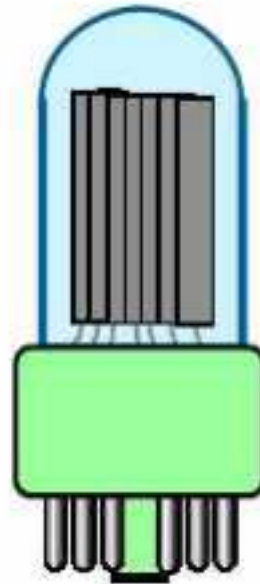


Диаграмма ЛСКМ с несколькими лазерами



Laser combiner объединяет несколько DPSS лазеров и выводит их в общий световод. **AOTF** выполняет две функции – выделение длины волны и регуляция мощности лазера. Слева – блок управления записью сигнала с ФЭУ.

Детектор сигналов – ФЭУ



Фотоэлектронный умножитель (ФЭУ) – вакуумный прибор. Квантовый выход (фотокатода) составляет не более 10-40%. Максимальная чувствительность – как правило, в синей области спектра (450 нм). ФЭУ с увеличенной полосой чувствительности в красной и ИК области имеют более низкий квантовый выход (менее 10%). Новейшие ФЭУ (на основе арсенида галлия) имеют квантовый выход до 40%.

Коэффициент усиления фототока – до 10^6 . Скорость считывания сигнала – в диапазоне гигагерц (10^9 Гц).

Работа ФЭУ

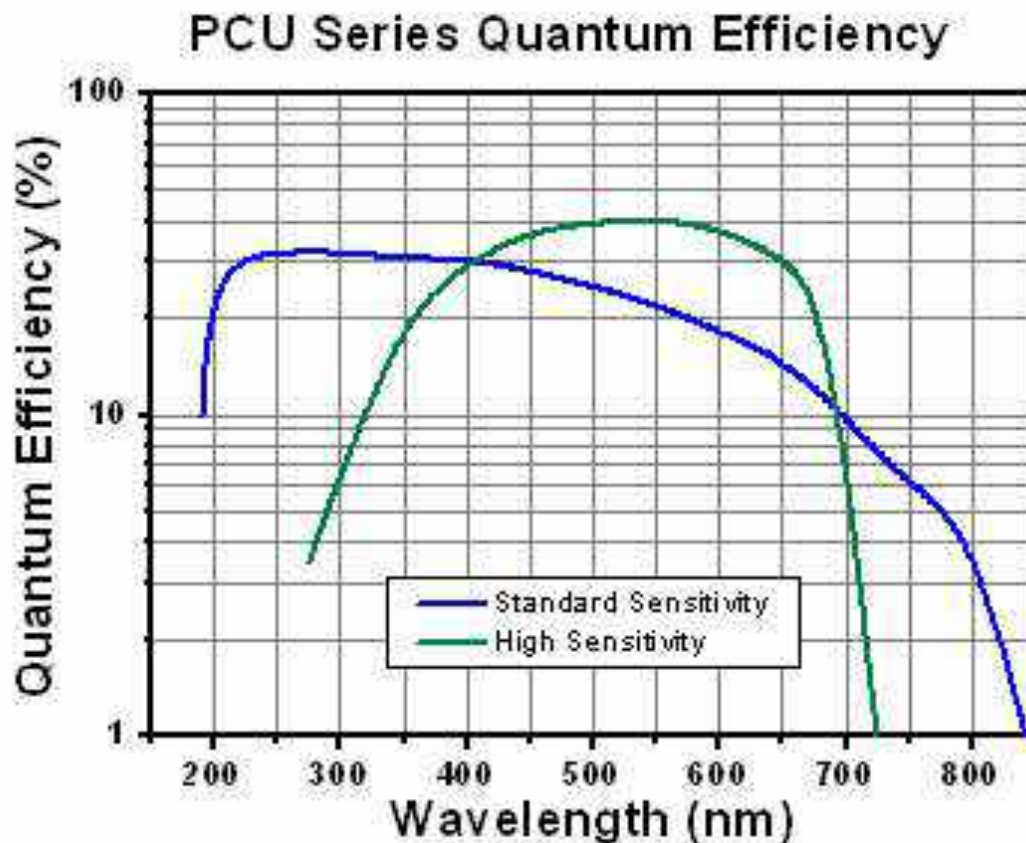
Фотоны, попадающие на входное окно ФЭУ, вызывают ток (несколько десятков-сотен тысяч электронов), который многократно усиливается в каскаде последовательных динодов.

Величина усиления тока регулируется напряжением между динодами (100-1000 V). На выходе ФЭУ ток составляет миллиамперы.

Величина тока на выходе ФЭУ в широких пределах пропорциональна количеству фотонов на входе – динамический диапазон современных ФЭУ достигает 20 бит (2^{20}).

Однако в микроскопе динамический диапазон ФЭУ обычно используется не полностью – оцифровка ведется в режиме не больше 16 бит (65536 уровней серого).

Кривая светочувствительности ФЭУ

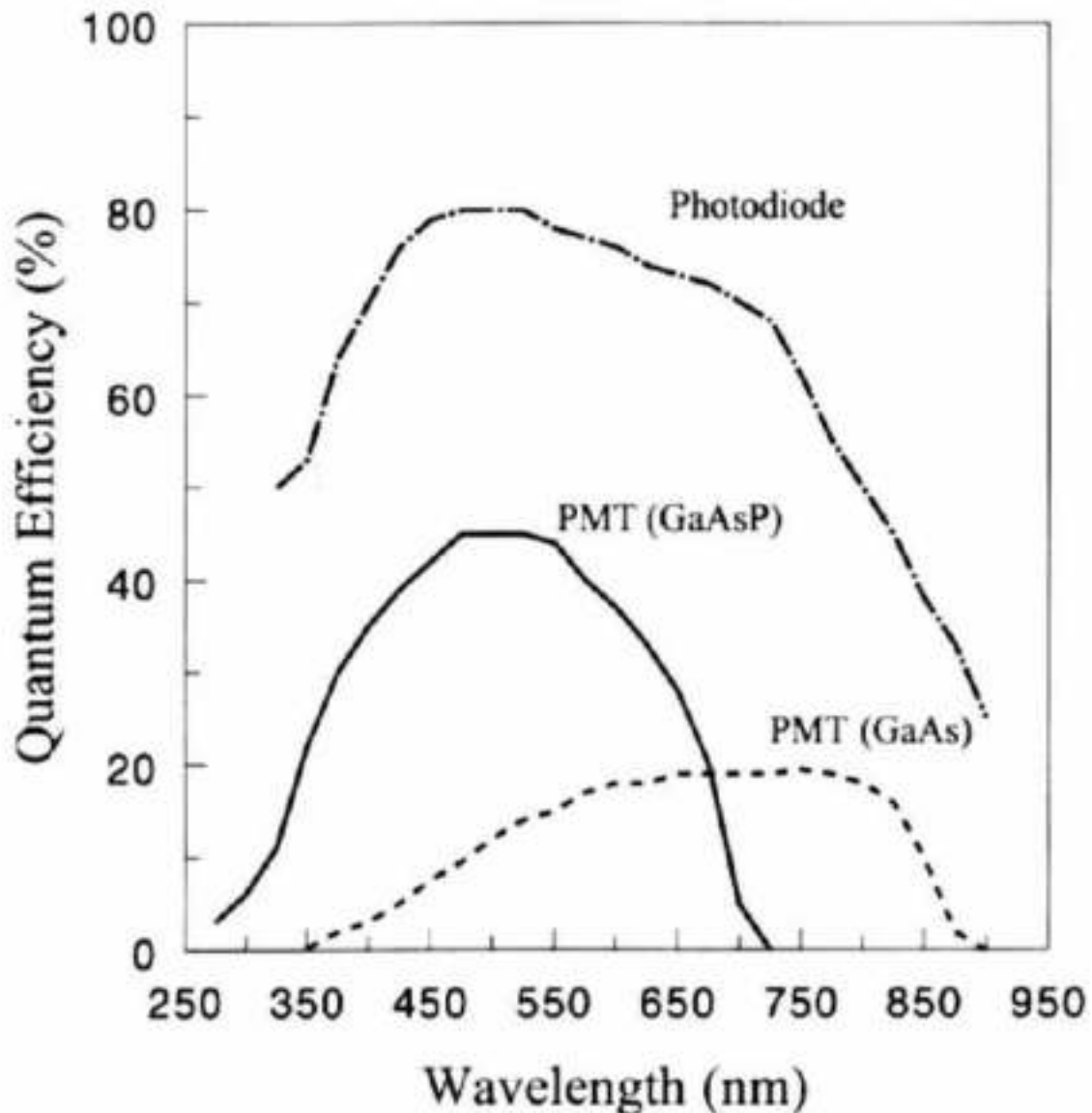


Современные ФЭУ имеют удовлетворительную чувствительность в диапазоне 450-650 нм, но быстро теряют ее в ближнем инфракрасном свете

Чувствительность детекторов

Чувствительность детектора на основе GaAsP в несколько раз выше, чем у старых ФЭУ, но значительно уступает даже старым фотодиодам.

Для детекции сигнала в инфракрасном свете (>700 нм) используются специальные ФЭУ на основе арсенида галлия (GaAs). Они имеют меньшую пиковую чувствительность, но значительно более широкий диапазон в ИК.



Регулировка ФЭУ

Чувствительность стандартных ФЭУ: около 15% в синей области и менее 4% в красной.

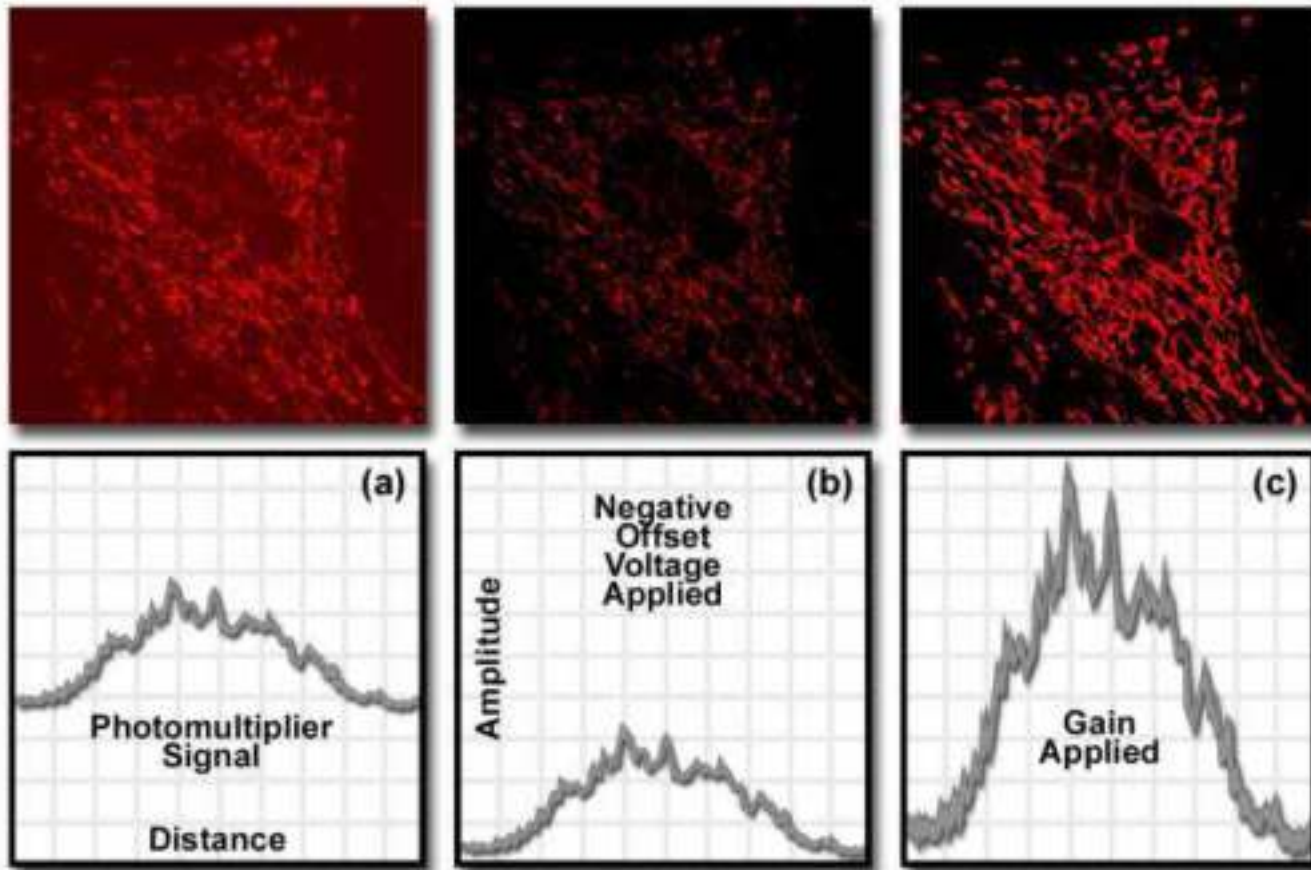
Основным источником шума является так называемый «Пуассоновский шум», связанный с ограниченным числом квантов света и их пуассоновским распределением во времени.

Минимальный шум соответствует разности потенциалов на динодах в диапазоне 400-600 В. Рабочий диапазон ФЭУ находится в пределах 200-800 В.

Предестальное напряжение на АЦП ФЭУ – отрицательное напряжение, которое регулирует темновой ток.

Настройка ФЭУ: увеличение напряжения на 50 В примерно соответствует удвоению сигнала на выходе.

Настройка ФЭУ



Настройка ФЭУ состоит в подборе усиления и пьедестального напряжения. (a) исходный сигнал; (b) после вычитания фона (offset); (c) после растяжения выходного сигнала (gain)

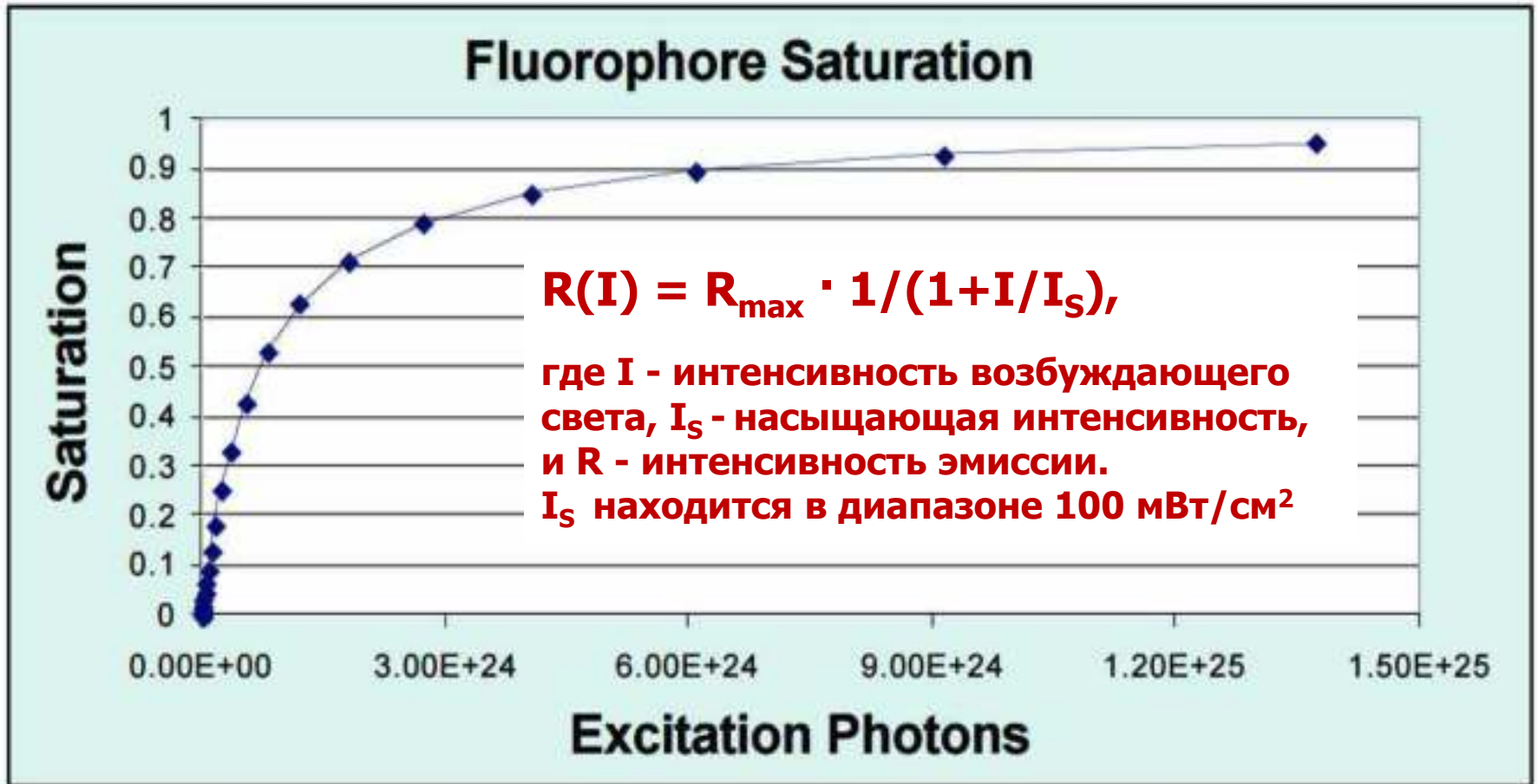
Настройка ФЭУ

Настройка ФЭУ соответствует растяжению гистограммы яркости в изображении, которое также может быть выполнено после записи цифровыми методами.

При записи 12-и битного изображения диапазон, приходящийся на картинку при настройках «по умолчанию», может быть слишком мал для 8-и битного конечного изображения. Последние модели конфокальных микроскопов дают 16-и битную глубину.

Кроме того, многие модели конфокальных микроскопов экспортируют «по умолчанию» изображение в формате 8 бит, и тогда растяжение гистограммы яркости приводит к появлению однородных зон (то есть потере полутонов).

Эффект насыщения



Насыщение достигается для большинства красителей при мощностях лазера около 1-10 мВт или менее. Дальнейшее увеличение мощности ведет к снижению конфокального эффекта за счет регистрации несфокусированного сигнала.

Насыщающая интенсивность

Насыщающая интенсивность возбуждающего света (I_s) может быть определена как:

$$I_s = k_e / \sigma,$$

Где $k_e = k_t + k_{nr}$ (k_t – скорость эмиссии и k_{nr} – скорость безызлучательного затухания); σ – площадь сечения поглощения молекулы флуорохрома.

Типичные значения: $\sigma = 10^{-16} \text{ см}^2$, $\tau_e = 10 \text{ нс}$, тогда насыщающая интенсивность $I_s = 4 \cdot 10^8 \text{ мВт/см}^2$ (для синего лазера, $\lambda = 488 \text{ нм}$). Такая плотность достигается при мощности лазера 0.8 мВт в пучке, сфокусированном в дифракционно-ограниченное пятно.

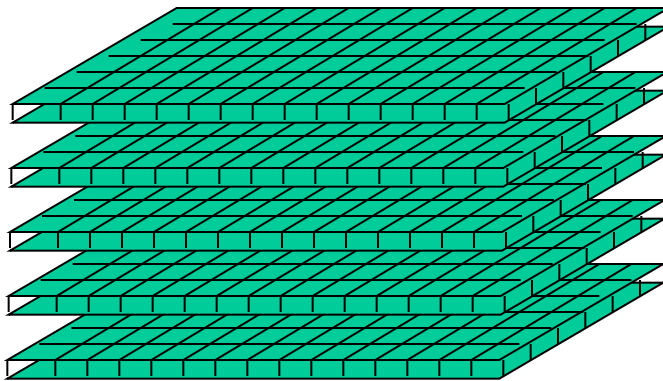
Дискретизация (sampling)

Цифровая запись означает дискретизацию сигнала по трем осям (x, y, z), по интенсивности (уровни серого), и по времени (t)

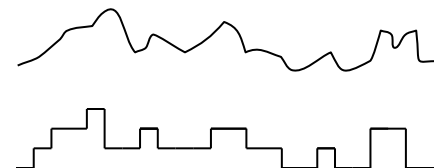
Дискретизация всегда влияет на разрешение!

В конфокальном микроскопе дискретизация является практически непрерывной – время передачи сигнала с ФЭУ ничтожно.

pixels
(voxels)



0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	22	45	66	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	65	12	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0
0	0	6	5	0	0	0	0	2	8	21	5	2	0	0	0
0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Эквивалентный размер пиксела

Эквивалентный размер пиксела – размер пиксела камеры (шага сканирования) при проекции в пространство предметов (на препарат). Он равен физическому размеру пиксела, деленному на общее увеличение системы микроскопа.

Для микроскопов, скорректированных на бесконечность, общее увеличение определяется объективом, системой переноса зрачка и проекционной линзой, установленной перед камерой (сканнером).

В конфокальной микроскопии эквивалентный размер пиксела определяется шагом сканирования, который измеряется в диаметрах диска Эри.

Выбор размера пикселей

Стандарты растра сканирования:

512x512

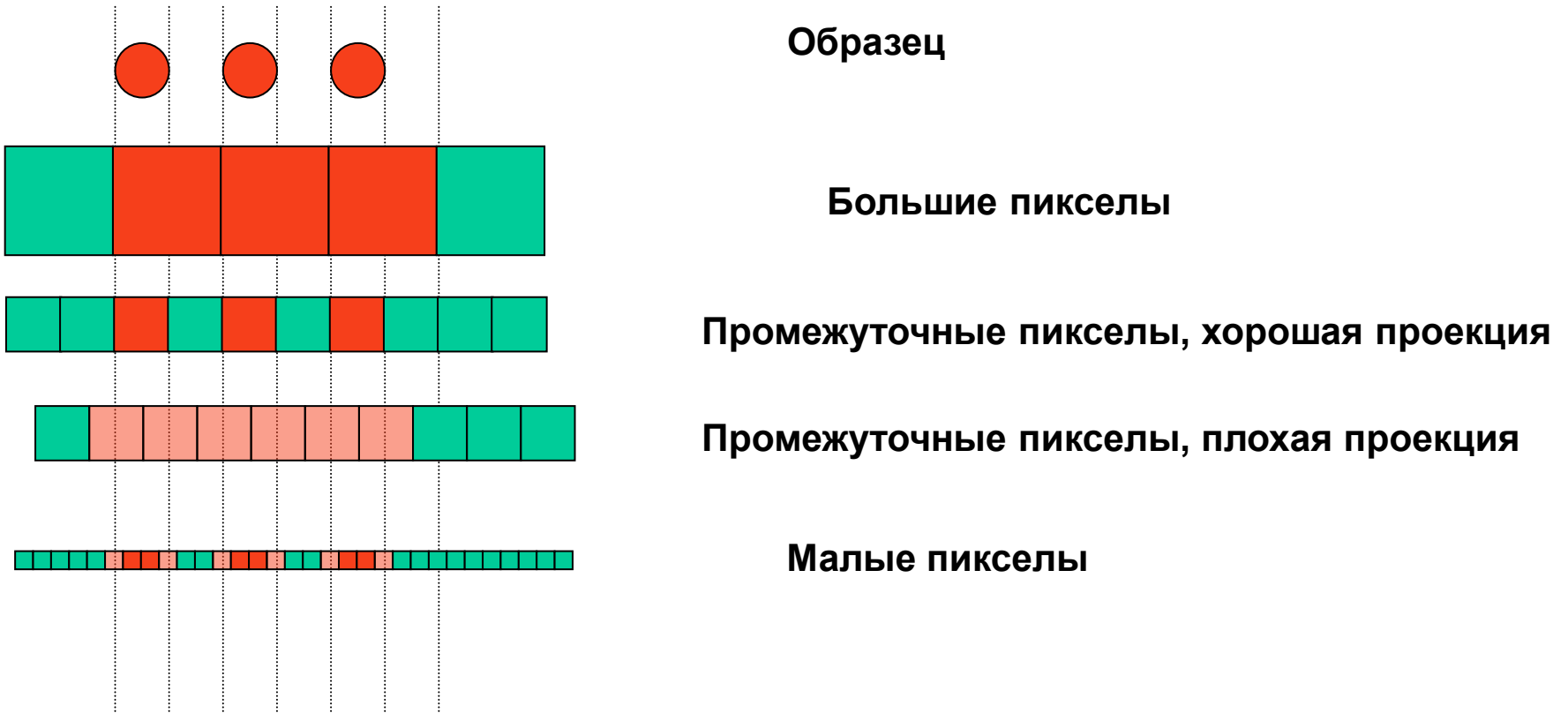
1024x1024

2048x2048

Больше пикселей — лучше?

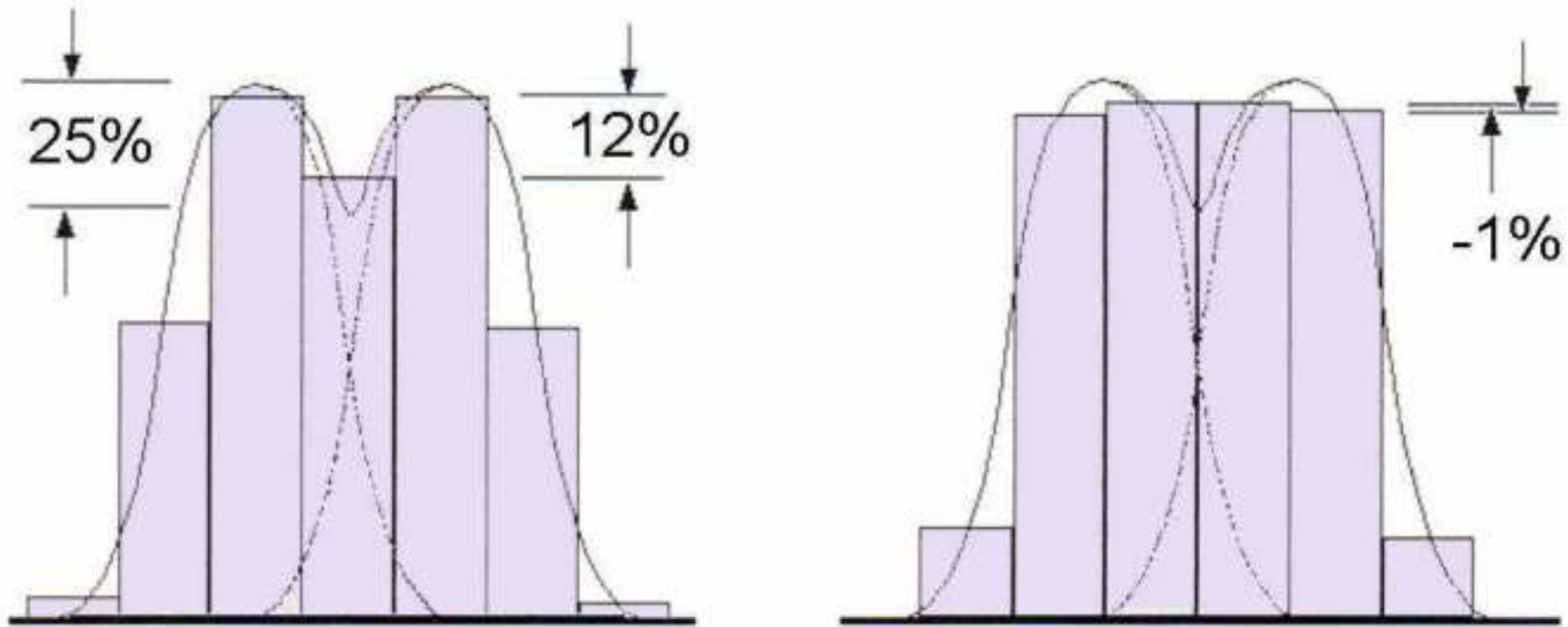
- Изображение более гладкое и содержит больше пространственной информации**
- Больше световая нагрузка на препарат**
- Медленнее сканирование (хуже разрешение по времени)**

Недостаточная дискретизация может приводить к потере информации



Правильный выбор размера пиксела уменьшает потери

Недостаточная пикселизация изображения



Максимальный эквивалентный размер пиксела, диктуемый телеграфной теоремой ($1/2$ радиуса диска Эри), в случае, когда объекты разделены минимальным промежутком, приводит к значительному снижению контраста при «удачной» пикселизации, и полной потере контраста при «неудачной» пикселизации.

Подбор условий записи изображения в конфокальном микроскопе

Настройка мощности лазера и усиления на ФЭУ.

Расчет шага сканирования, исходя из апертуры объектива. Как правило, программное обеспечение, поставляемое с микроскопом, не позволяет провести прямой расчет – величина шага кодируется. Правильный расчет делается исходя из размеров диска Эри.

Расчет времени сканирования кадра: время экспозиции одной точки (dwell time, μs), умноженное на число пикселей в кадре. Время сканирования всего кадра подсказывает программа. Возможен обратный вариант – вы устанавливаете время сканирования и размер раstra (512*512, 1024*1024, прямоугольный район), и тогда можете посмотреть время экспозиции в точке.

Теорема дискретизации для конфокальной микроскопии

- i) Предел разрешения:
 $0.4 \times \text{wavelength}/\text{NA} = \text{Resolvable Distance}$
- ii) Теорема дискретизации (одномерный случай):
2 pixels is smallest optically resolvable distance
- iii) Расчет максимально допустимого размера пиксела:
 $\text{Resolvable Distance}/2 = \text{smallest resolvable point}$

Минимальная дискретизация (Nyquist sampling)

Пример:

Объектив 100x, 1.40 NA, 530 nm (ФИТЦ)

Теоретическое разрешение = 0.20 мкм

Максимальный размер шага сканирования -
менее 0.1 мкм (100 нм).

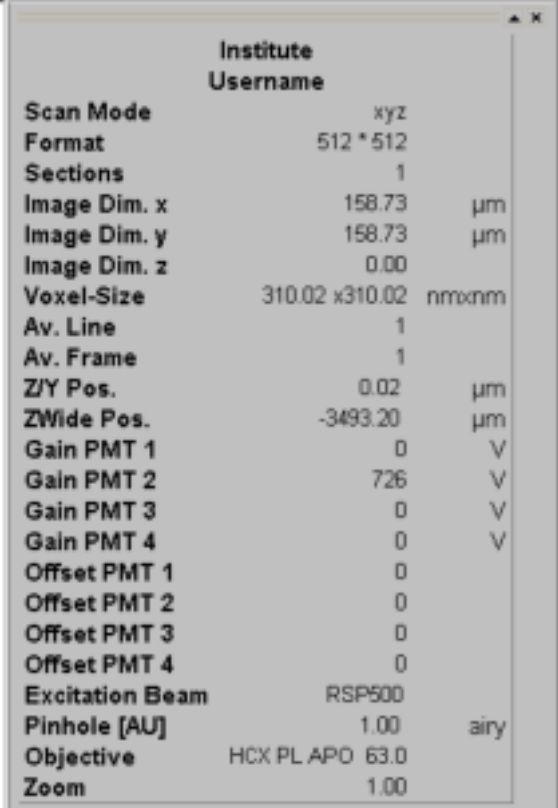
Поле зрения объектива – 220 мкм.

Доступно для сканирования – 150*150 мкм

При формате 512x512 пиксели будут
слишком большими

Что делать?

Использовать большее число пикселей
(1024x1024; 2048x2048) или растягивать
изображение (zoom).



Institute	
Username	
Scan Mode	xyz
Format	512 * 512
Sections	1
Image Dim. x	158.73 μm
Image Dim. y	158.73 μm
Image Dim. z	0.00
Voxel-Size	310.02 x310.02 nm:nm
Av. Line	1
Av. Frame	1
Z/Y Pos.	0.02 μm
ZWide Pos.	-3493.20 μm
Gain PMT 1	0 V
Gain PMT 2	726 V
Gain PMT 3	0 V
Gain PMT 4	0 V
Offset PMT 1	0
Offset PMT 2	0
Offset PMT 3	0
Offset PMT 4	0
Excitation Beam	RSP500
Pinhole [AU]	1.00 airy
Objective	HCX PL APO 63.0
Zoom	1.00

Растяжение (zooming)

Масштабирование (расятжение) означает, что вы используете тот же растр (число шагов), скорость сканирования и освещение для записи изображения с меньшей площади (уменьшаете шаг сканирования).

Во многих случаях для достижения правильного шага необходимо растяжение (zoom) в 2 и более раз.

Соответственно, световая нагрузка на препарат возрастает с уменьшением шага сканирования (пропорционально плотности шагов на единицу площади). Это влечет за собой нежелательные эффекты – выцветание, фототоксичность (для живых клеток).

Пример минимального расчета

- Объектив X10 с апертурой 0.3 для изображения GFP:
- $(0.4 \times 520)/0.3 = 693\text{nm}$ (разрешение)
- $693/2 = 346.6\text{nm}$ (допустимый размер пиксела)
-
- Область сканирования = $1500\mu\text{m}$; Box Size = 1024 pixels
- Шаг: $1500/1024 = 1464\text{nm}$, что больше допустимого размера
- Для данного формата сканирования:
- $1464/346.6 = 4.2$ – фактор растяжения (zoom)
- Другой вариант - сканировать все поле в формате 4096x4096 (размер пиксела составит 366 нм, что примерно соответствует расчетам - 346.6 нм)

Скорость сканирования: разрешение по времени

В современных микроскопах скорость измеряется в герцах и составляет от 1000 до 4000 Гц. Скоростные (резонансные) сканеры позволяют достичь частоты сканирования около 10 кГц, но за счет снижения качества изображения.

Снижение скорости сканирования приводит к тому, что:

- собирается больше света (возрастает время экспозиции в точке)**
- увеличивается фотообесцвечивание и фототоксичность**
- ограничивается пространственное разрешение**

Увеличение скорости сканирования дает противоположные эффекты, но снижает отношение сигнал/шум

Факторы, определяющие качество изображения

Пространственное разрешение

Определяется оптикой, но может ухудшаться при недостаточной плотности сканирования. Получение максимального разрешения возможно только при закрытой диафрагме (меньше диска Эри).

Глубина изображения (разрешение по уровням серого, бит)

Определяется детектором, но может ограничиваться малым потоком фотонов и неправильной настройкой ФЭУ.

Отношение сигнал/шум

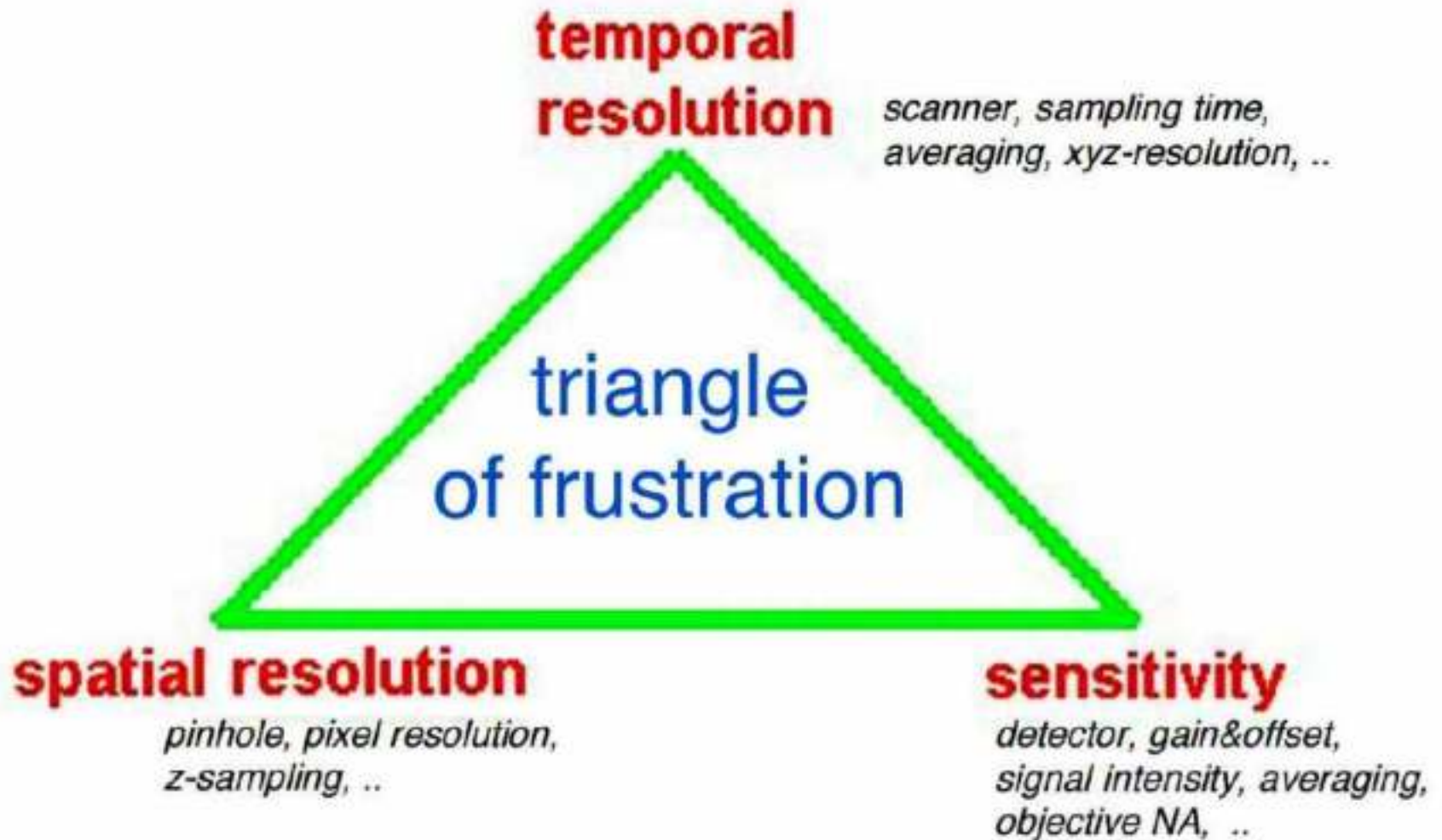
Определяется ФЭУ, мощностью лазера, экспозицией и автофлуоресценцией. Часто ограничивается жизнеспособностью клеток или выцветанием образца.

Разрешение по времени

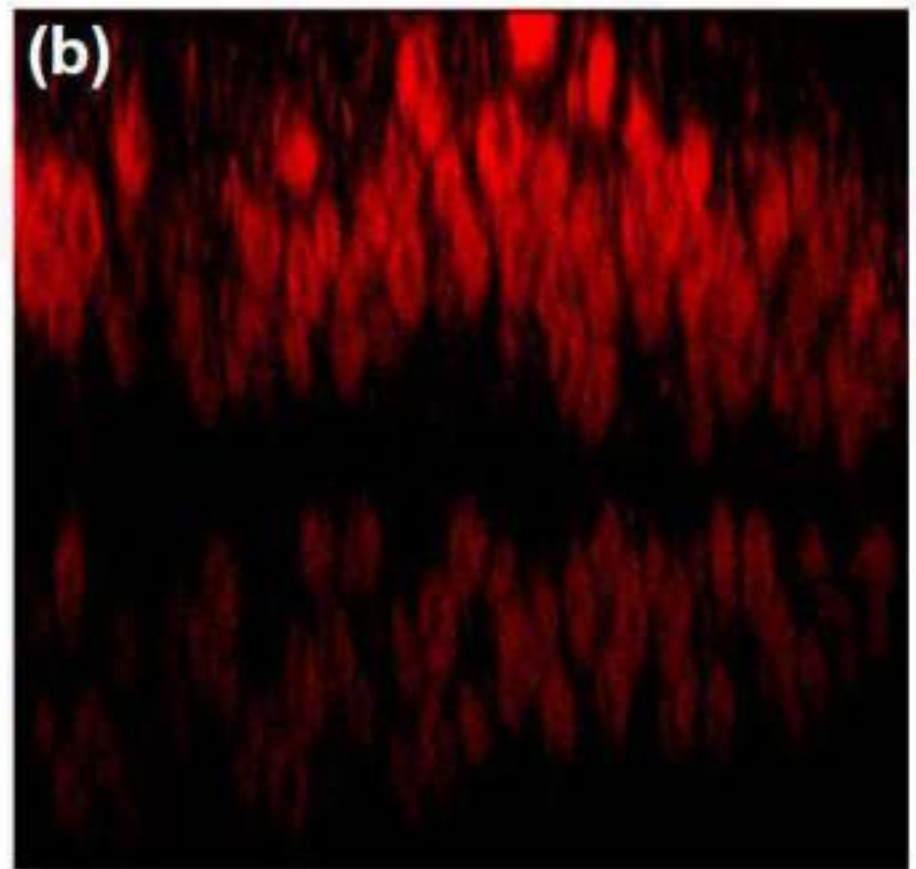
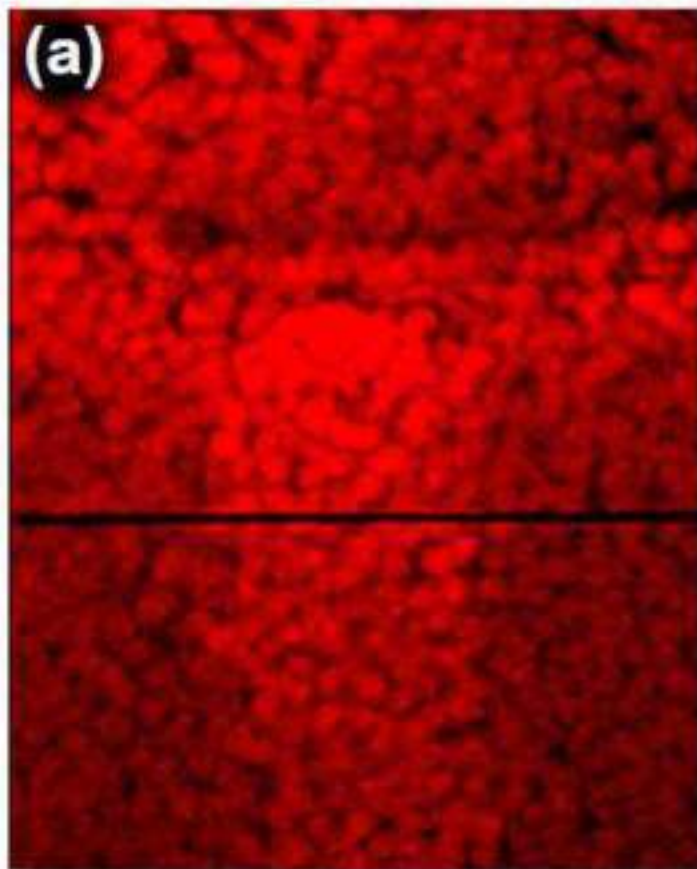
Зависит от скорости сканирования и размера раstra (512x512; 1024x1024 и т.д.).

Реальная картина всегда представляет собой компромисс между вышеперечисленными условиями.

Конфокальные компромиссы

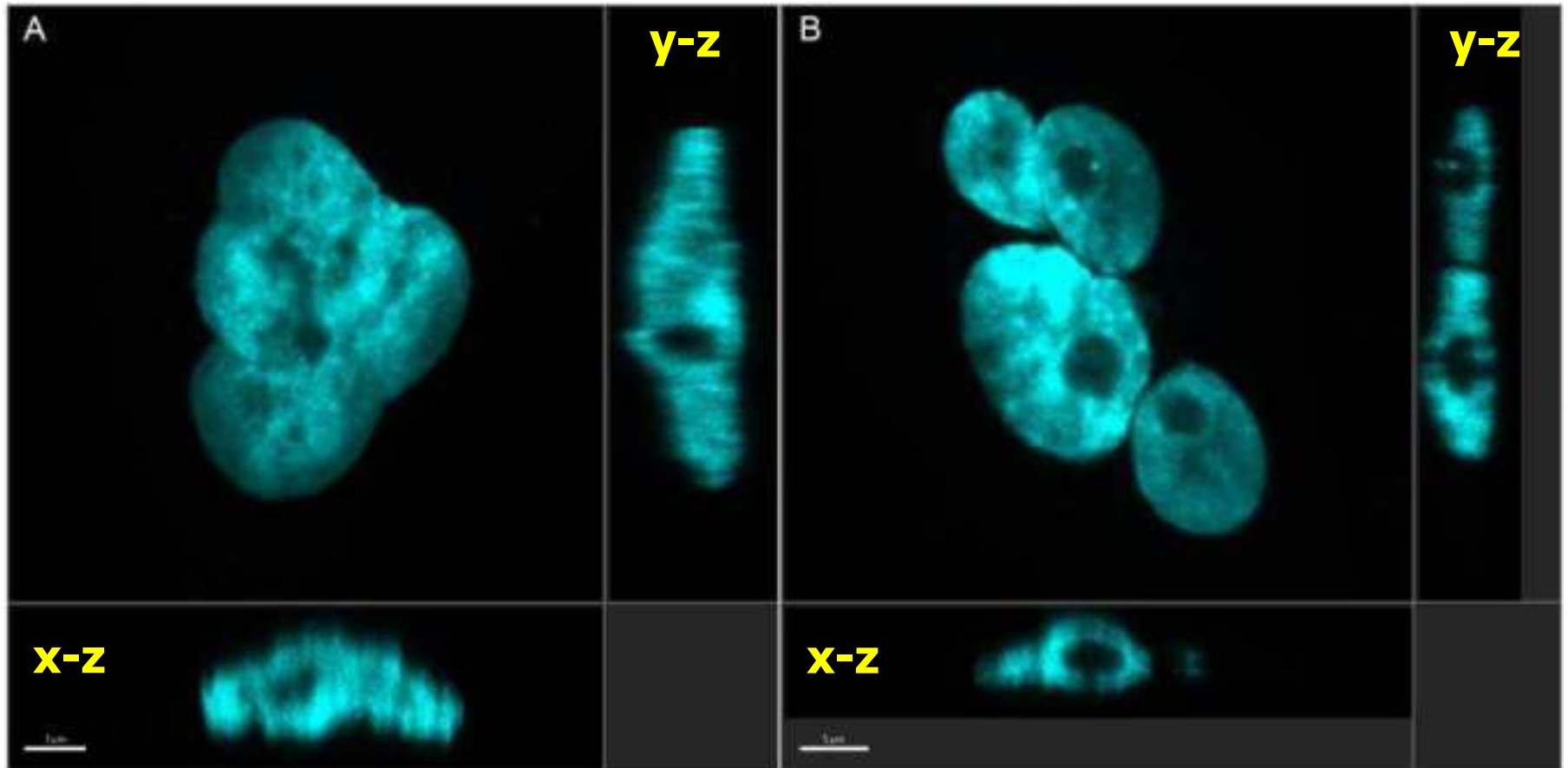


ЛСКМ: изображения в плоскостях x - y и x - z



Разрешение ЛСКМ по оси z в 3-4 раза меньше, чем в плоскости x - y . Из-за этого для трехмерного анализа шаг сканирования в плоскости x - y часто увеличивается для достижения равного разрешения в пространстве x - y - z .

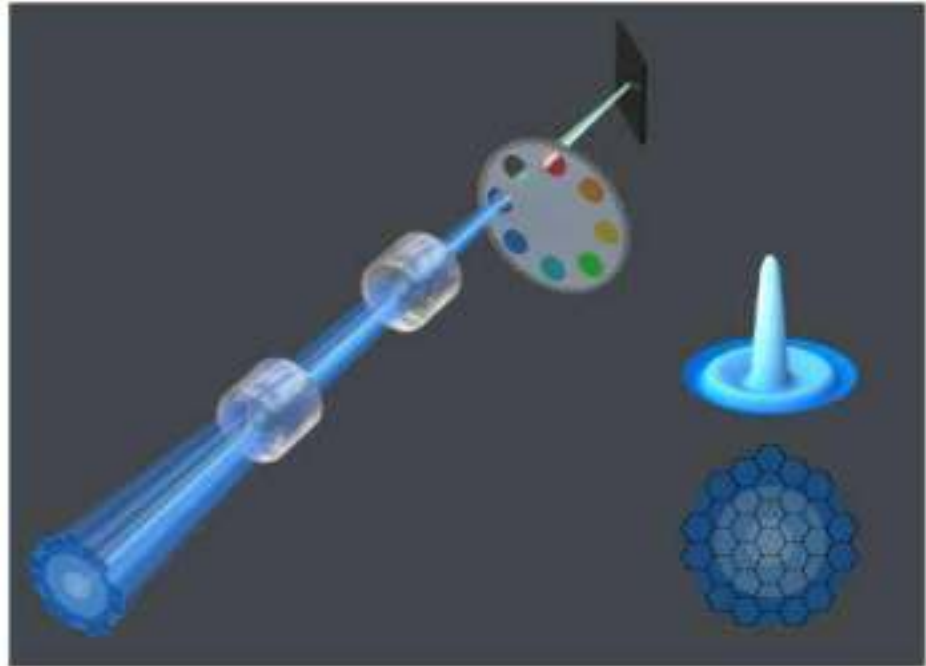
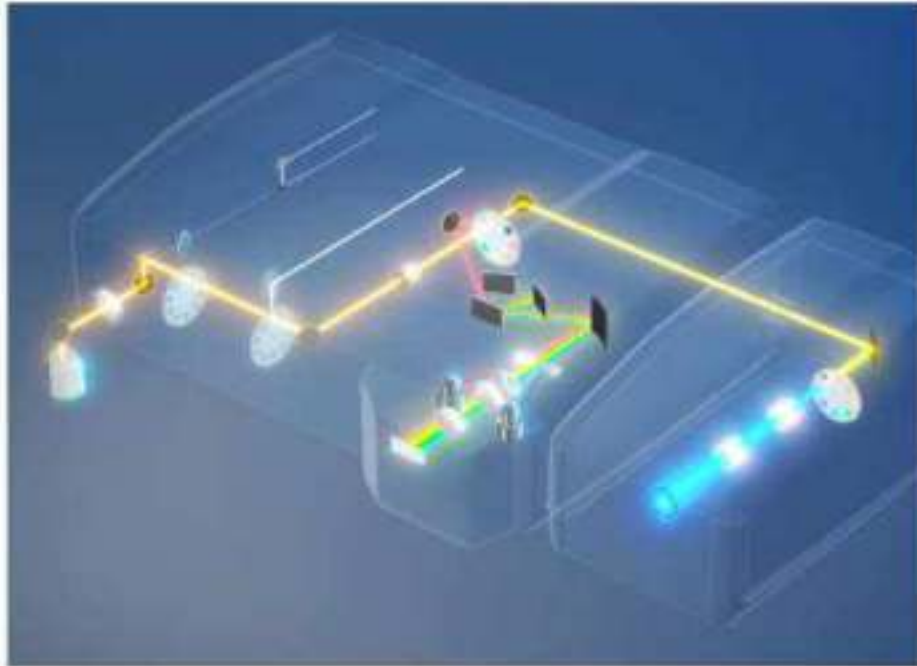
ЛСКМ: изображения в плоскостях x-y и x-z



Окраска Hoechst 33342. Слева – нормальное ядро. Справа – множественные ядра после ускользания клетки из митоза. Темные зоны в ядре – ядрышки. LSM780, съемка с размером пиксела 70 нм, шаг по оси z – 100 нм. Линейка – 5 мкм.

**Лазерный сканирующий
конфокальный микроскоп с
детектором Airyscan (Zeiss)**

Airyscan 2 system



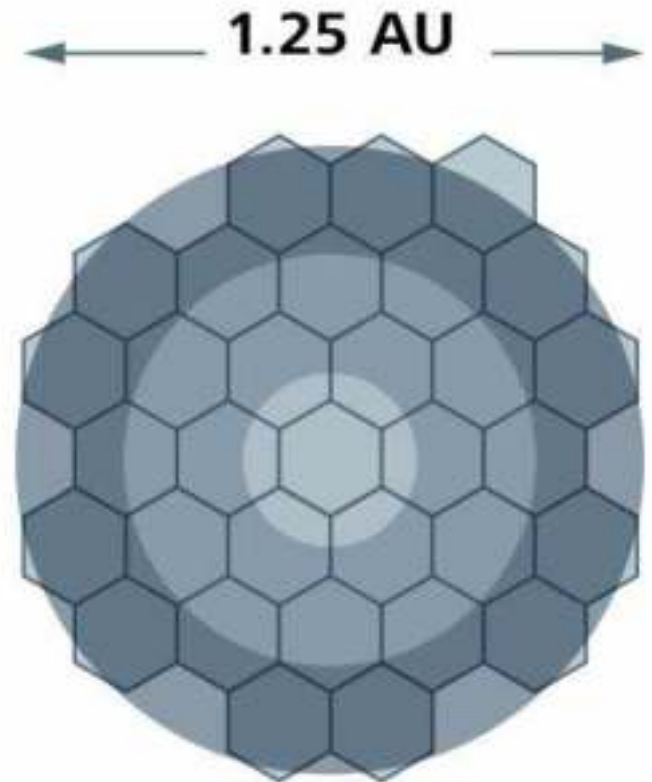
Airyscan detection concept (from ZEISS) features a 32-channel gallium arsenide phosphide photomultiplier tube (GaAsP-PMT) area detector that is located in a pinhole-plane and collects signals equivalent to ≈ 0.2 AU pinhole opening at every scan position (right).

Детектор Airyscan

Схема конструкции детектора Airyscan 2, расположенного в плоскости диафрагмы. Он состоит из 32 детекторов на базе галий арсенид фосфина (GaAsP). Центральный элемент располагается на главной оптической оси. Размер каждого гексагонального детектора соответствует 0,2 диаметра диска Эри. Общий размер панели детекторов соответствует примерно 1,25 диаметра диска Эри.

Распределение интенсивности от точечного источника изображено на схеме.

Сигнал от каждого детектора может рассматриваться независимо. Это позволяет проводить восстановление изображения (деконволюцию) более точно.



Использование Airyscan

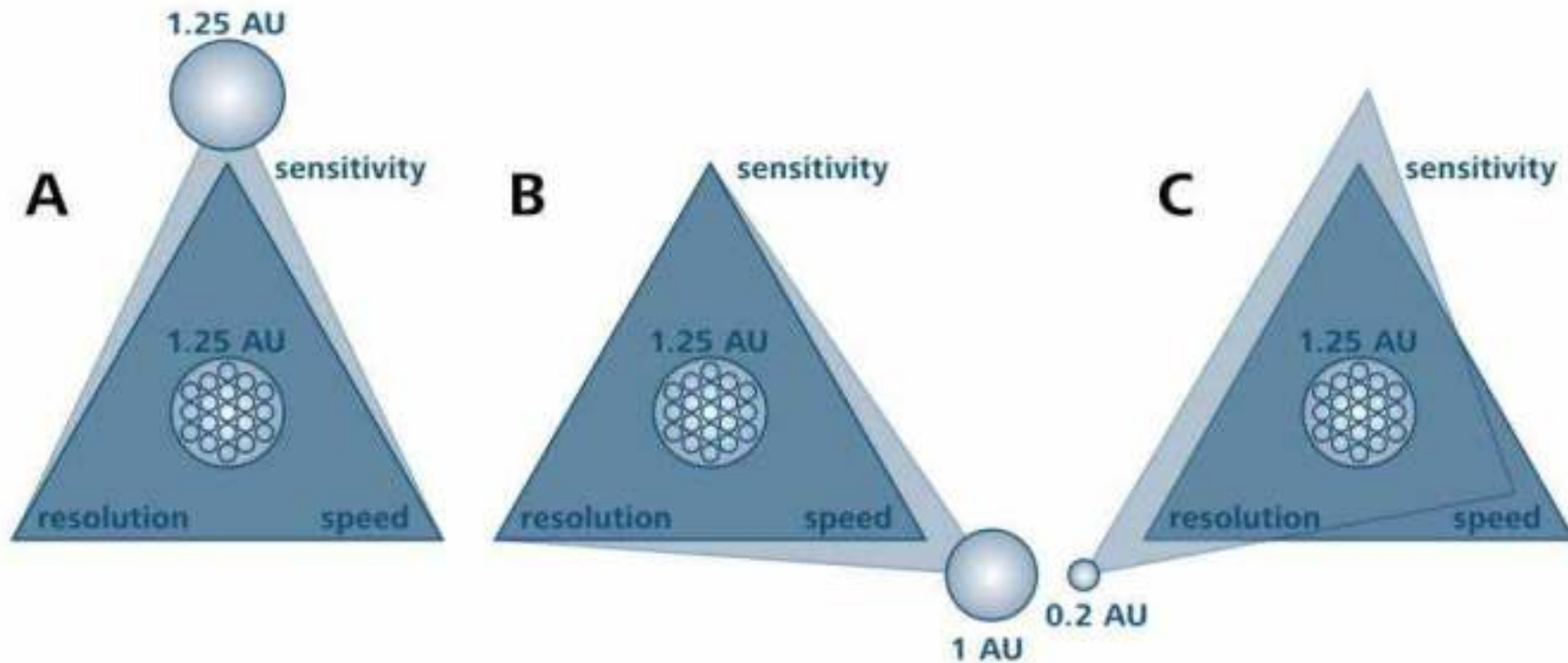
Детектор Airyscan 2 значительно расширяет возможности конфокального микроскопа.

Он позволяет использовать ЛСКМ в следующих режимах:

- Быстрое сканирование,**
- Увеличенное отношение сигнал/шум**
- В режиме суперразрешения.**

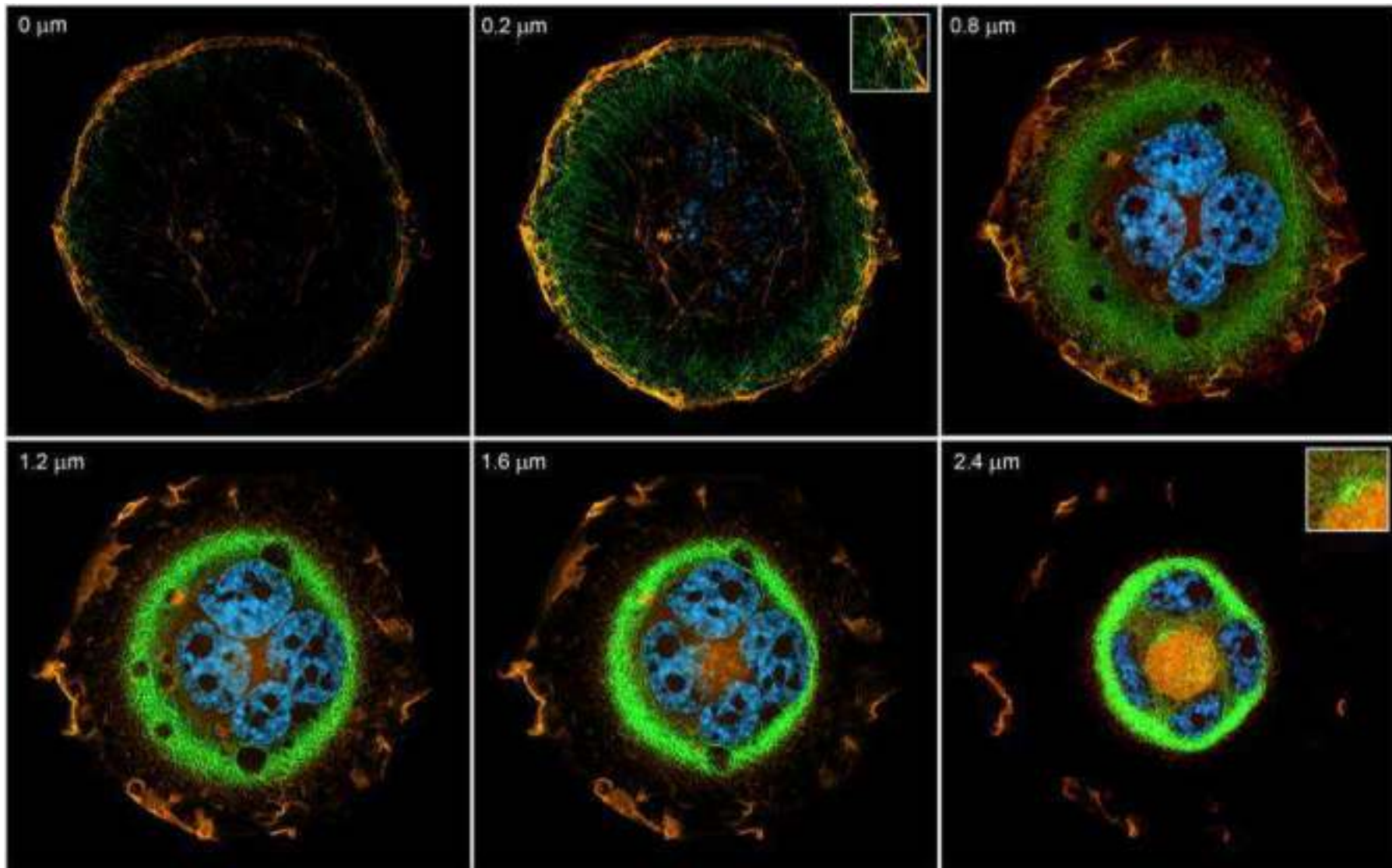
Используя настройки сканнера можно проводить сканирование с одновременной записью до 4 точек с сохранением хорошего качества и достаточного отношения сигнал/шум.

Улучшение параметров сканирующего микроскопа

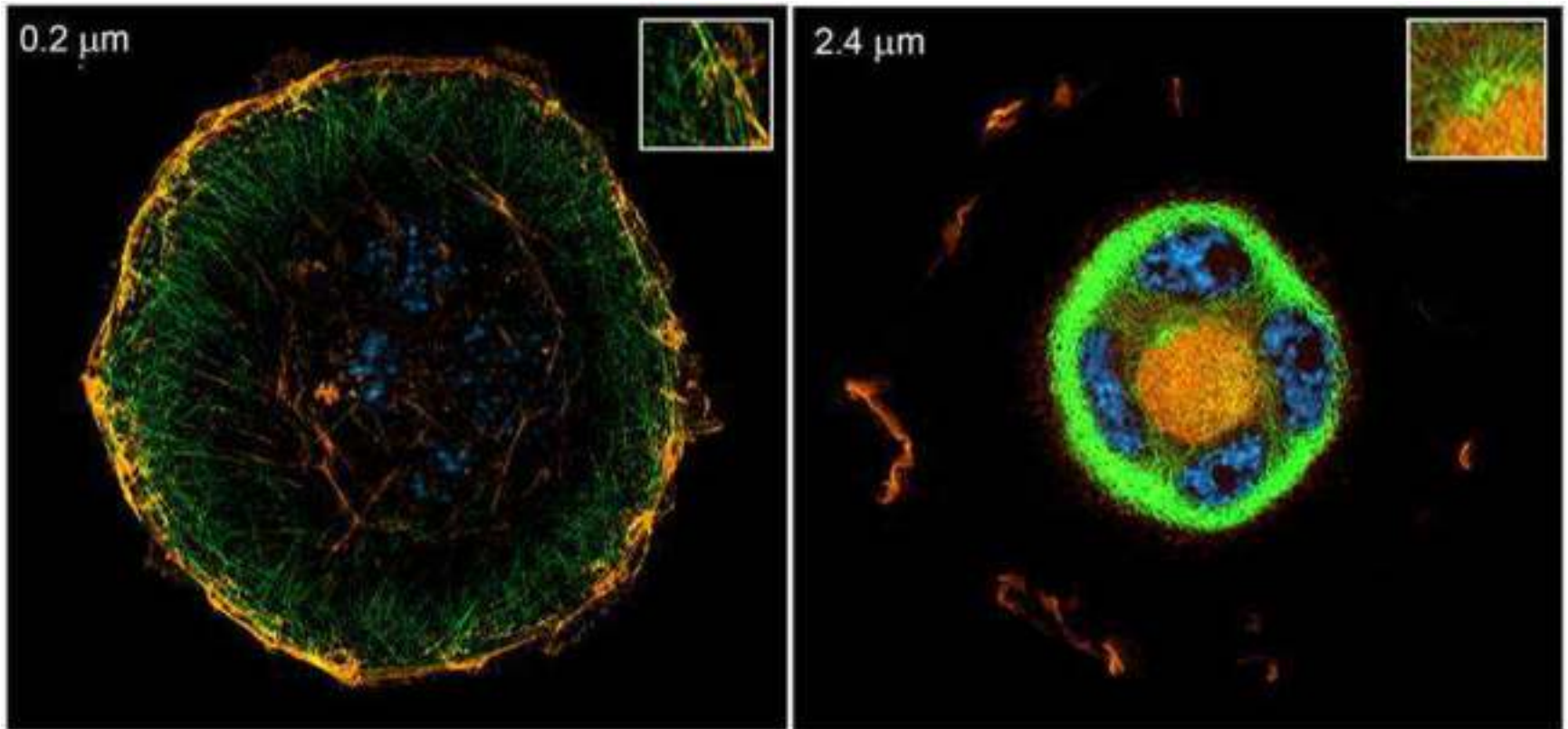


За счёт различных способов обработки сигнала может быть увеличена чувствительность (незначительно - A), скорость (B) или разрешение (C).

Серийные оптические срезы – Zeiss, LSM980



Микротрубочки на оптических срезах (Airyscan)



Слева – край клетки, справа – район centrosомы. Зеленый канал – микротрубочки, оранжевый канал – актин.