



Konfokální mikroskop
confocal laser scanning microscope (CLSM)

Historie

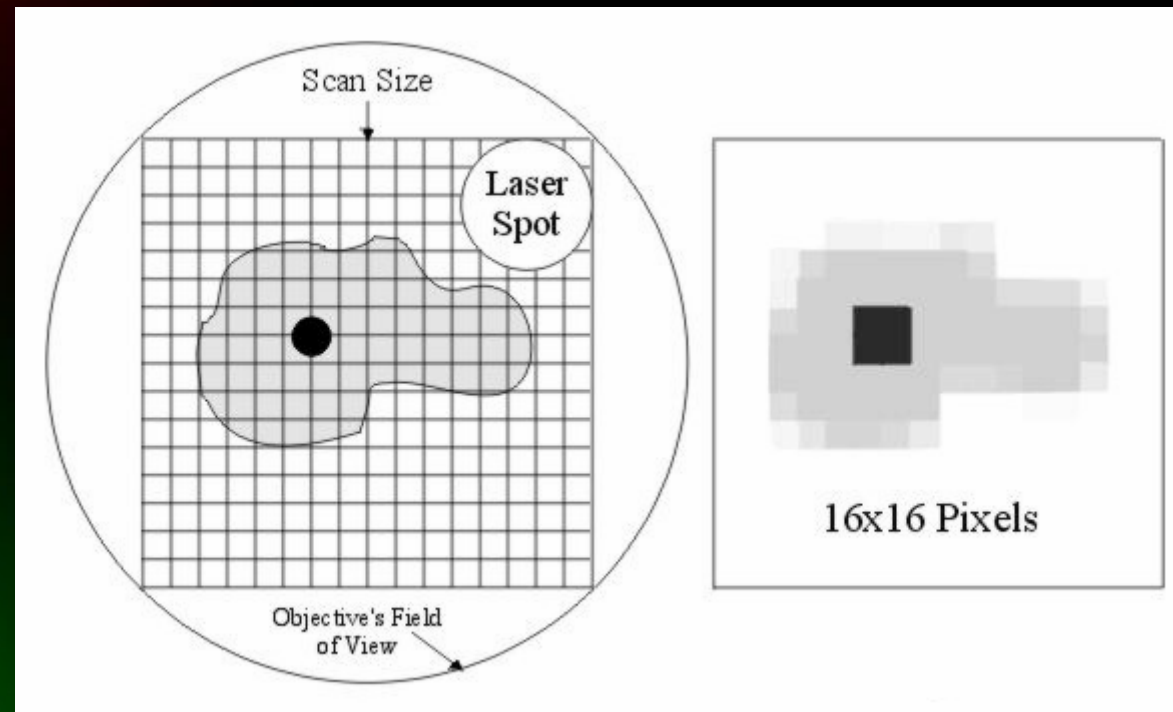
- Minský M. (60. léta 20. století)
- Petráň M. a Hadravský M. (1967) - konstrukce konfokálního mikroskopu pracujícího na bázi rotace Nipkowova kotouče
- rozvoj od konce 70. let 20. století
 - laserový paprsek, počítač
- dvou (multi-) fotonový mikroskop

Confocal - conjugate (sbíhat) + focal (ohniskový)

obě clonky jsou umístěny v ohniscích

Laser

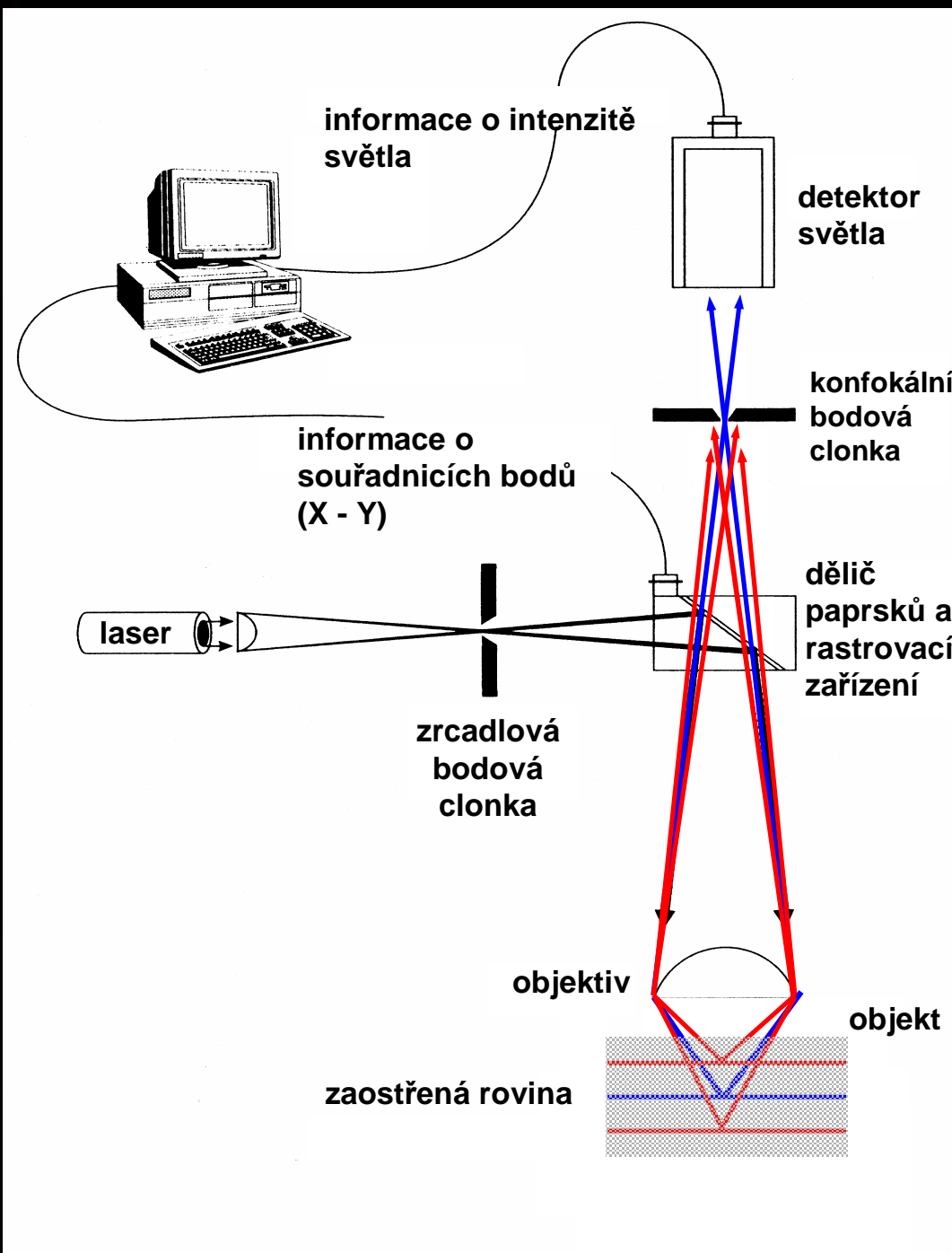
Scanning



Microscop

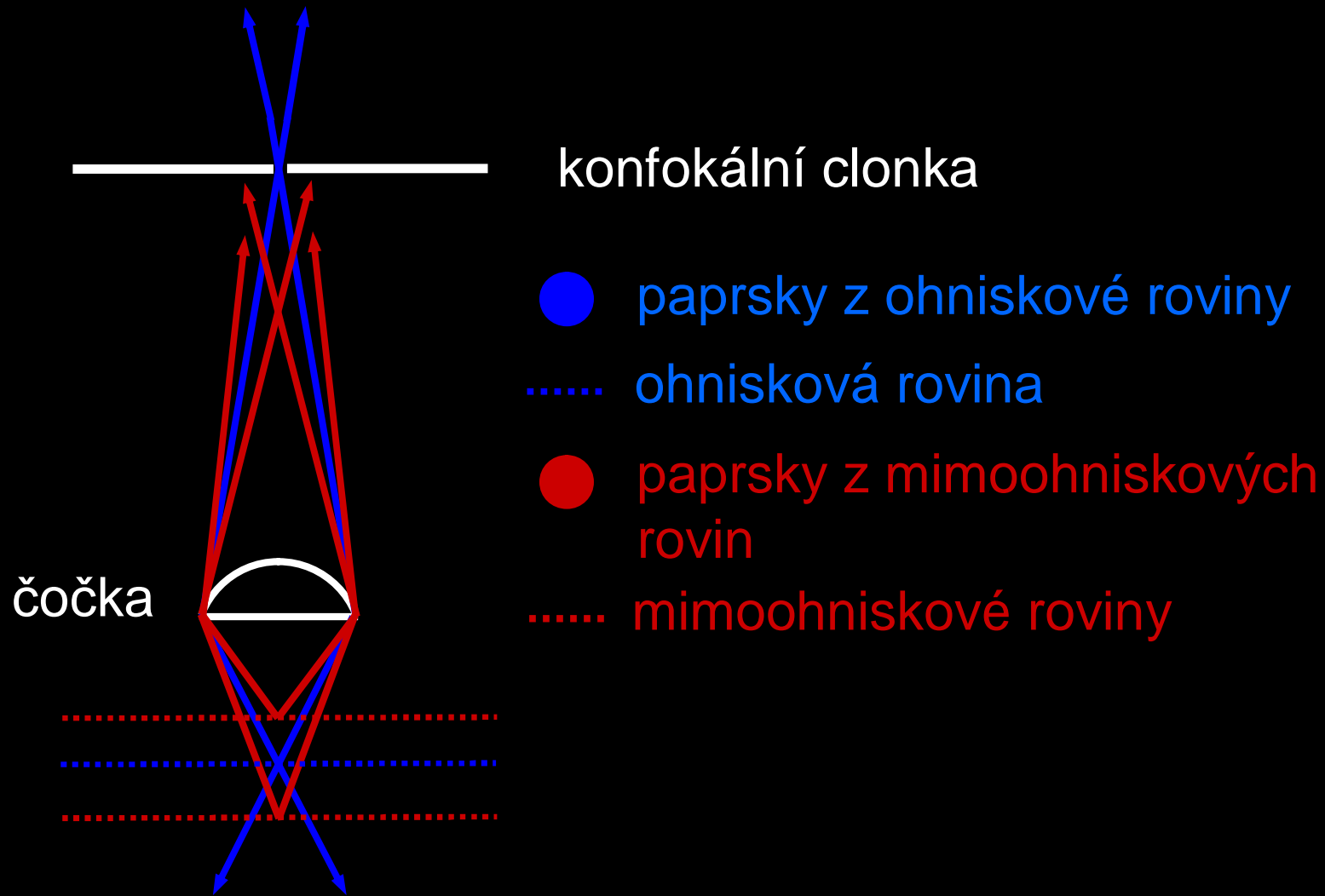
(internet)

Schéma současného
konfokálního
mikroskopu
(s rozmítaným laserovým
paprskem)

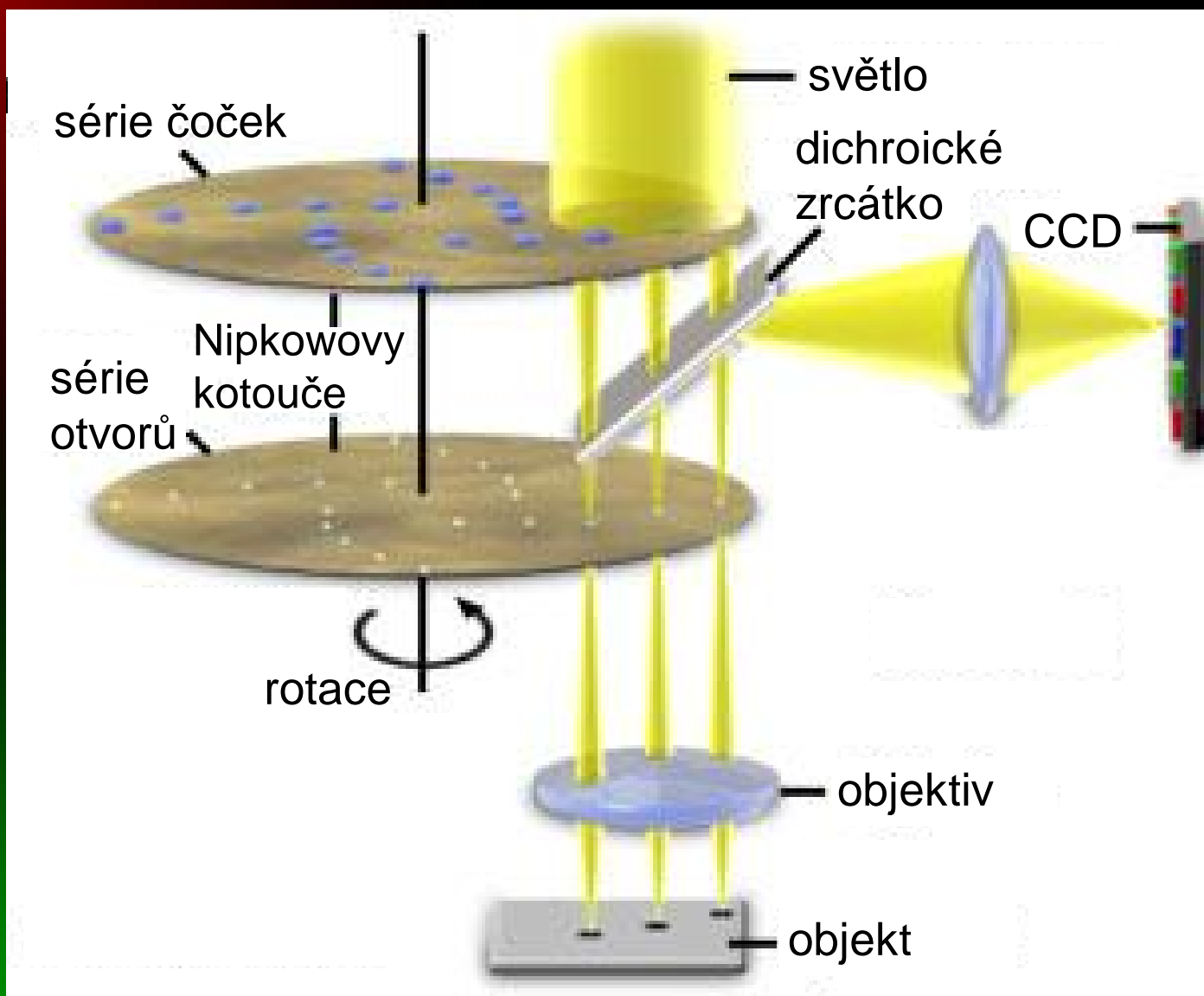


(Vesmír, 1995)

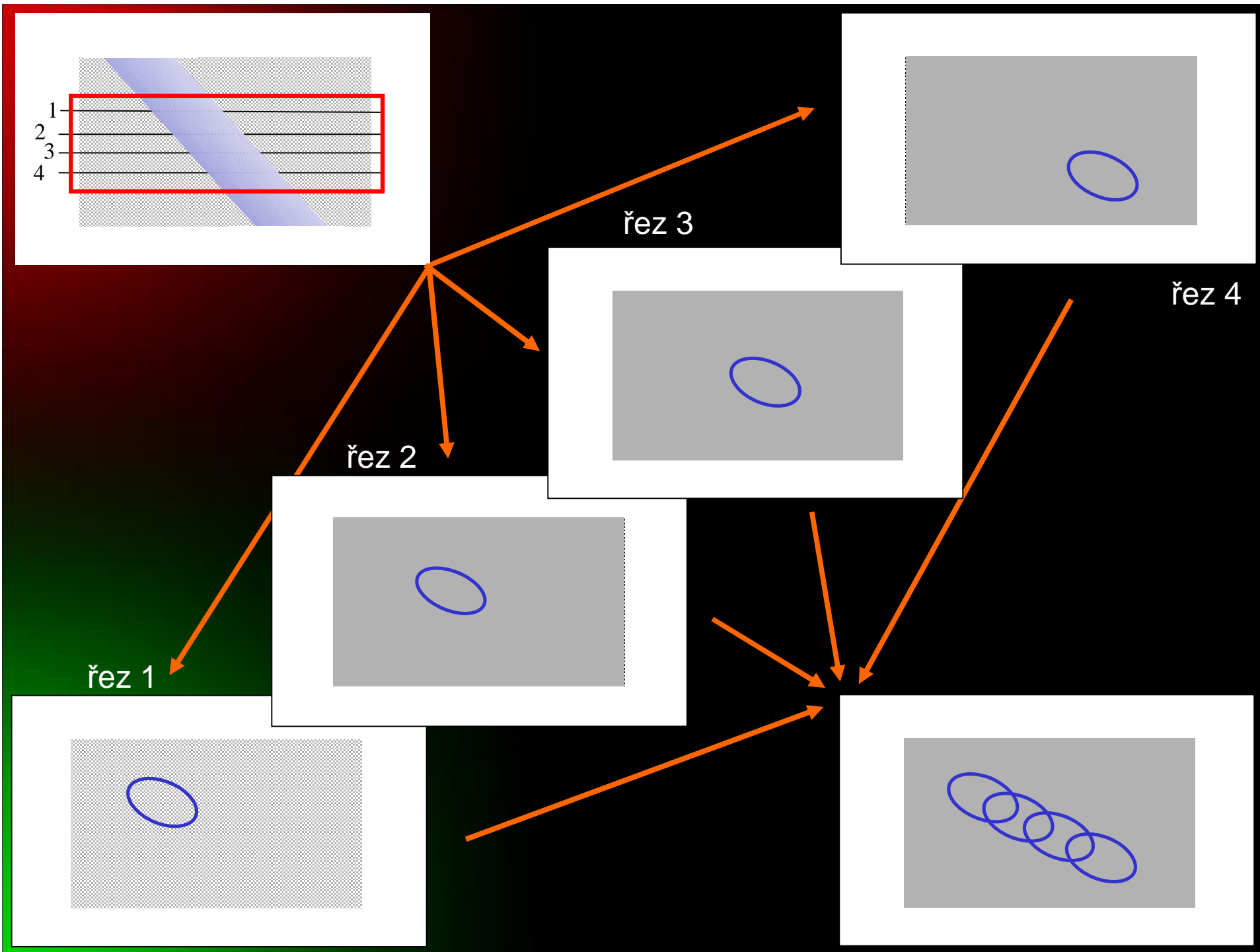
Princip konfokálního mikroskopu

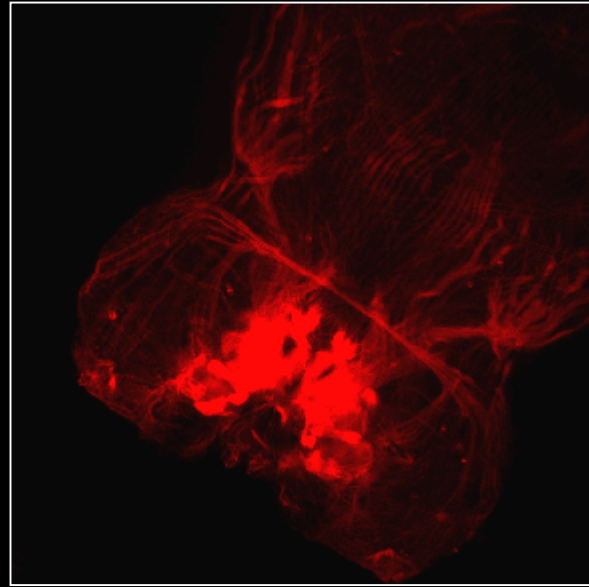
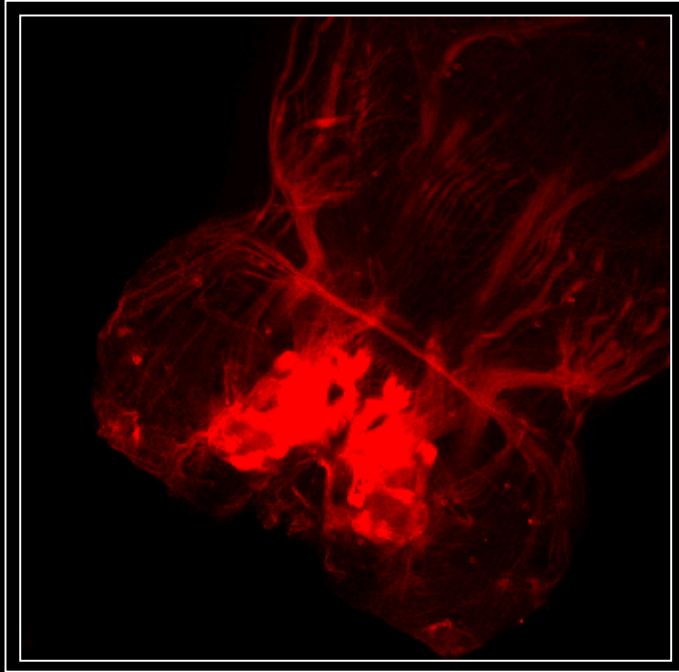


Konfokální mikroskop na bázi Nipkowova kotouče

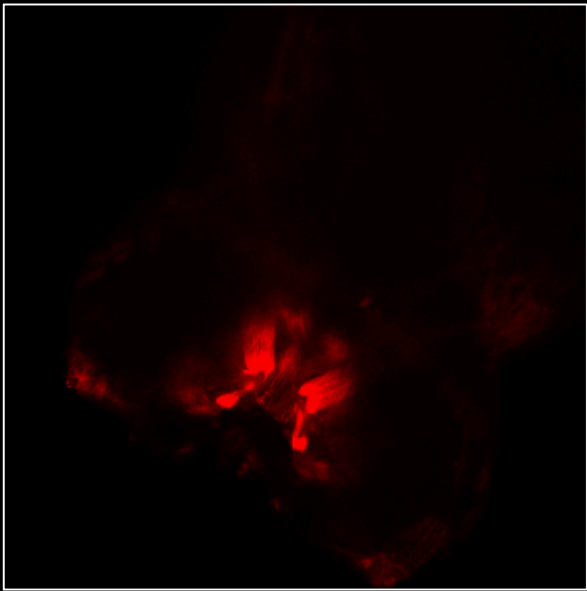


(internet)

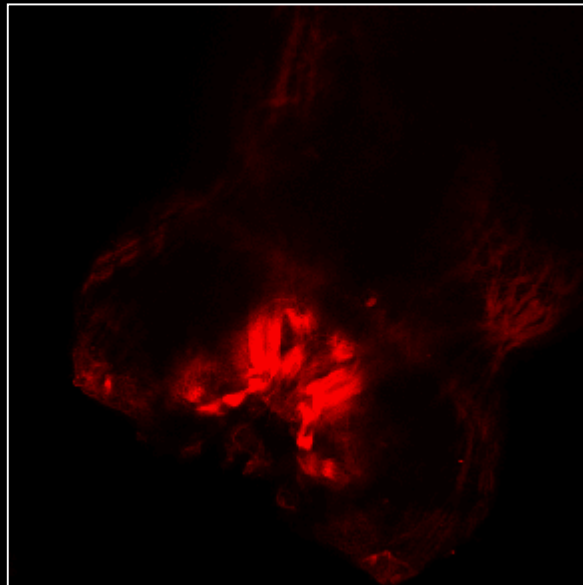




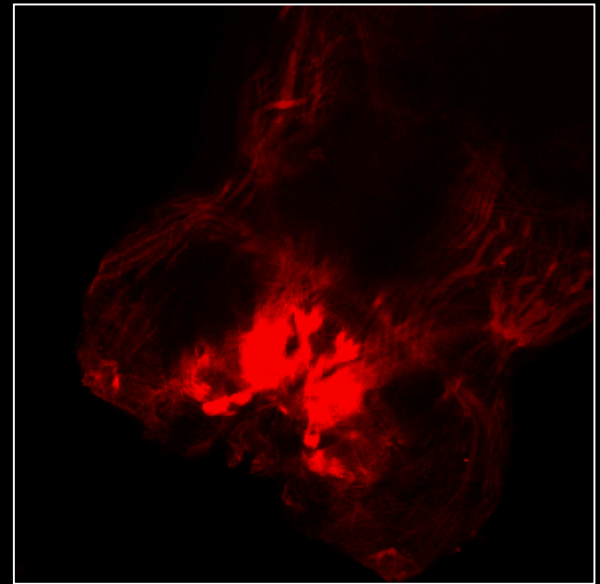
řez 4



řez 1



řez 2



řez 3

Využití světla pro CLSM

- reflexe - textura a složení povrchů - elektronických součástek, studium neuronových sítí (pomocí Ag), ...
- difúze
- fluorescence - struktura buňky a tkání, studium metabolických drah, ...

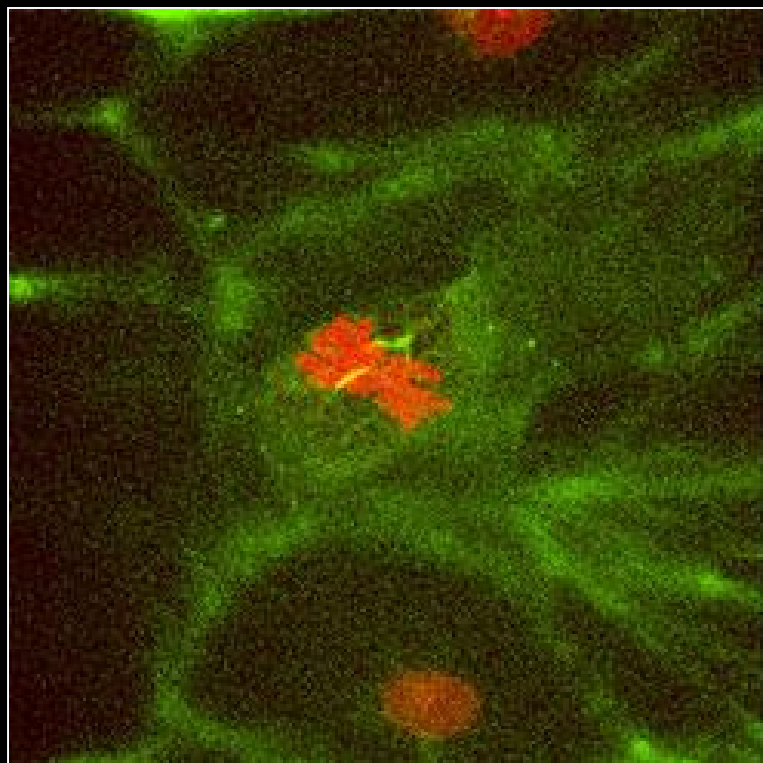
Výhody CLSM

- odstranění mimoohniskových rovin
- vysoký kontrast obrazu
- neinvazní metoda
- zachování prostorového uspořádání
- schopnost vytvoření prostorové rekonstrukce
- digitální forma výstupu - rotace, perspektiva, ...
- schopnost zobrazení buňky - tkáně - mnohobuněčného organismu
- současné použití až 3 kanálů - barev

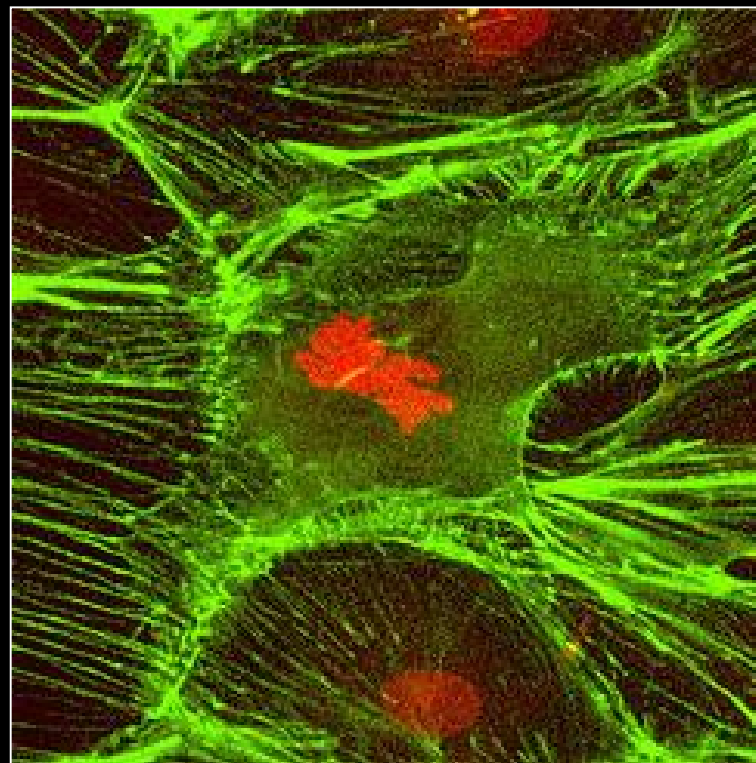
Nevýhody CLSM

- délka zpracování materiálu i snímků => „vyhasínání fluorescence“
- neostré snímky při nízké intenzitě fluorescence
- pořizovací cena (mikroskop, konfokální nástavec, počítač + program)

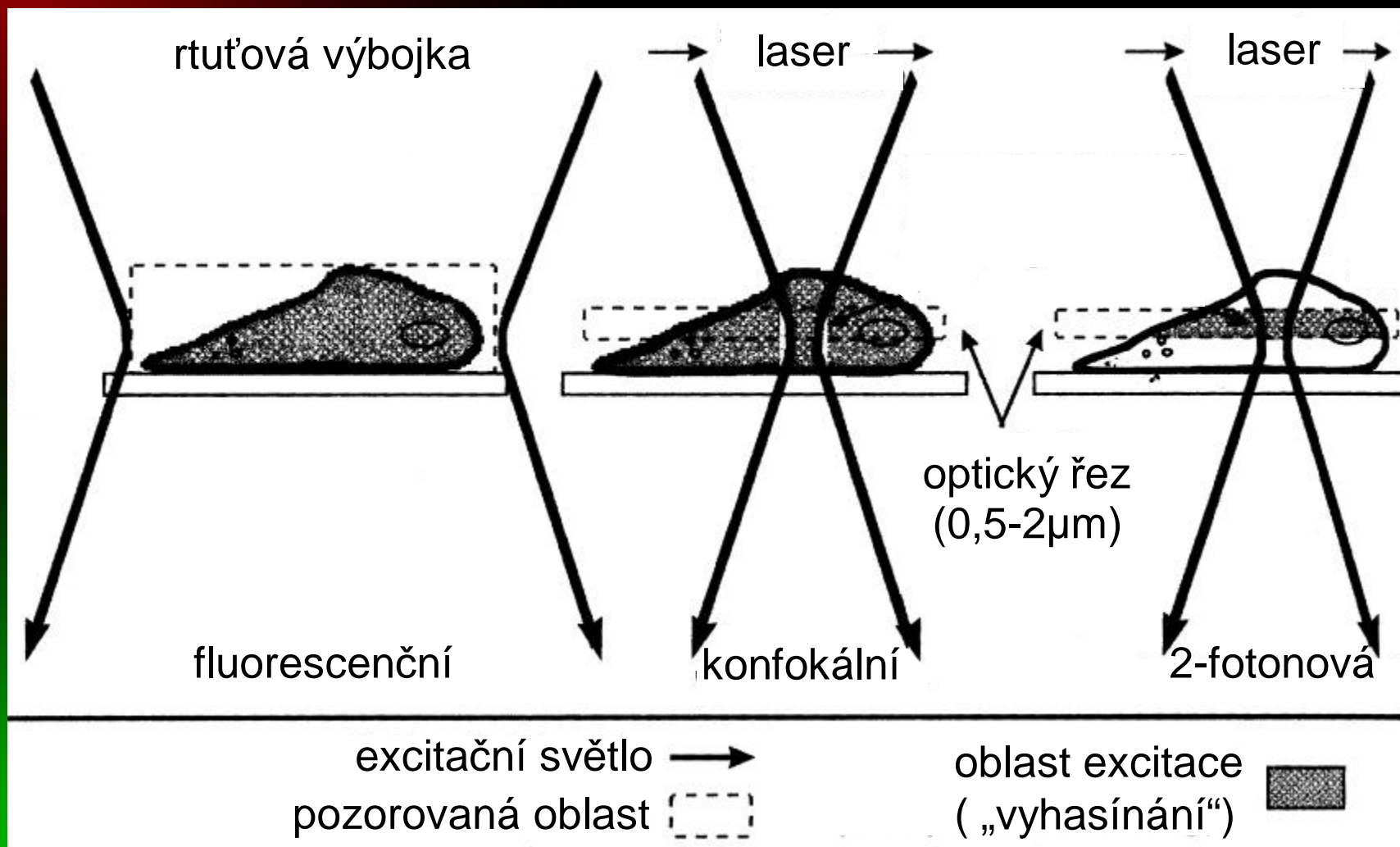
snímek z digitálního fotoaparátu



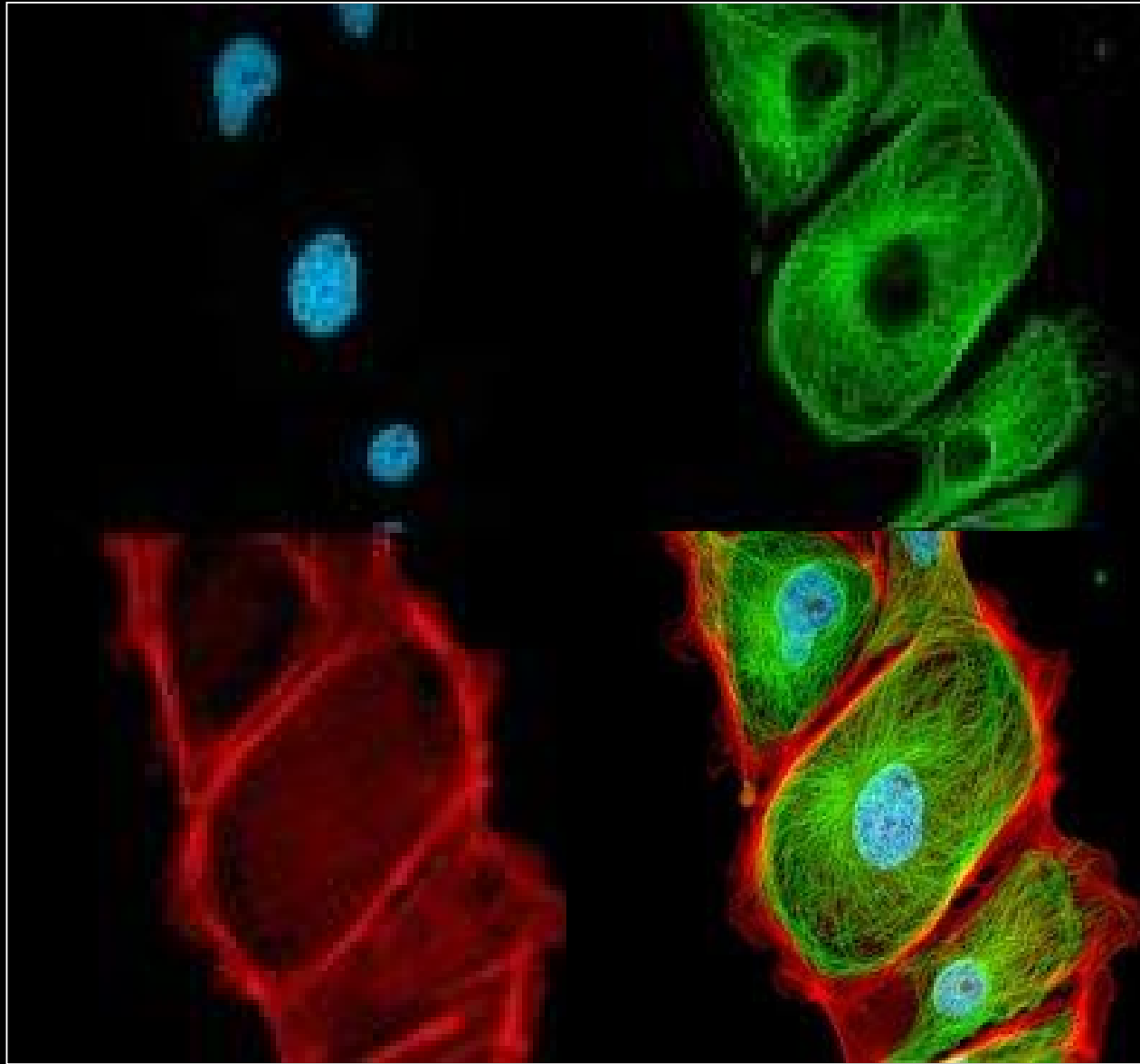
snímek z konfokálního mikroskopu



Srovnání 3 metod užívaných ve fluorescenční mikroskopii



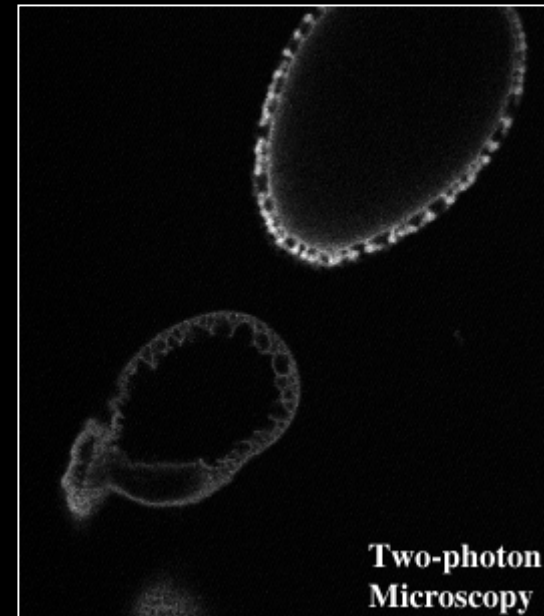
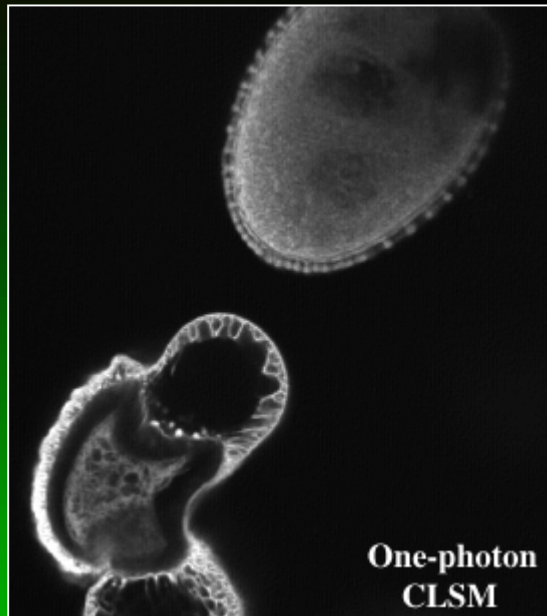
(Lacey, 1999)



(Olympus)

Dvoufotonová mikroskopie

- absorpce 2 fotonů fluorochromem ve stejném okamžiku => záření s dvojnásobnou vlnovou délkou (poloviční energie) => excitační záření 700 nm (červená) => emitované záření 900 nm



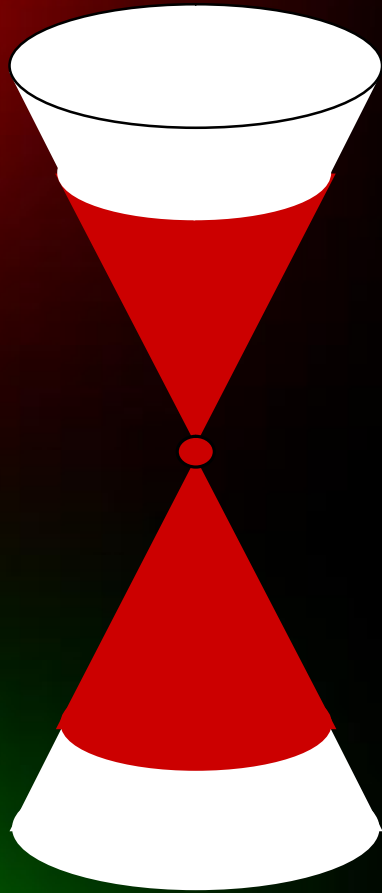
Výhody

- se zvyšující se intenzitou záření zdroje se zvyšuje pravděpodobnost absorpce 2 fotonů fluorochromem
- excitace fluorochromu jen v zaostřené rovině => odpadá nutnost konfokální clonky => maximum světla
- velká vlnová délka (700 nm) => pomalejší „vyhasínání“
 - menší rozptyl světla ve vzorku
 - větší penetrace světla ve vzorku
 - malá fototoxicita (x UV záření)

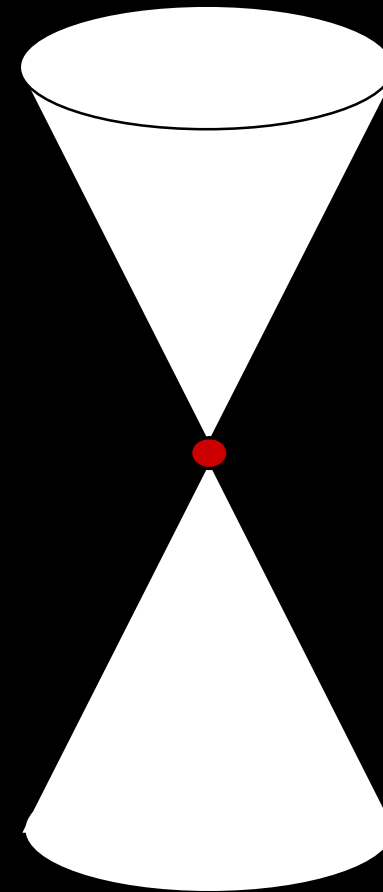
Nevýhody

- cena Ti Sapphire laseru
- ohřev vzorku => užití laserových pulsů než plynulé ozáření

Srovnání konfokální a 2-fotonové mikroskopie



konfokální



2-fotonové

(internet)

■ oblast excitace

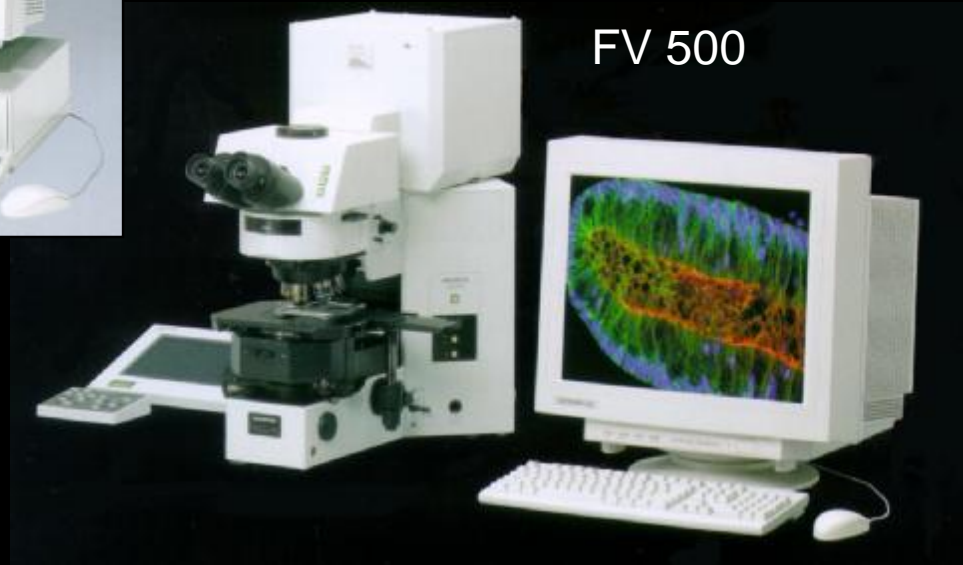
● pozorovaná oblast

Konfokální mikroskopy

OLYMPUS



FV 300



FV 500

Leica, Nikon, Zeiss, ...

Olympus Fluoview

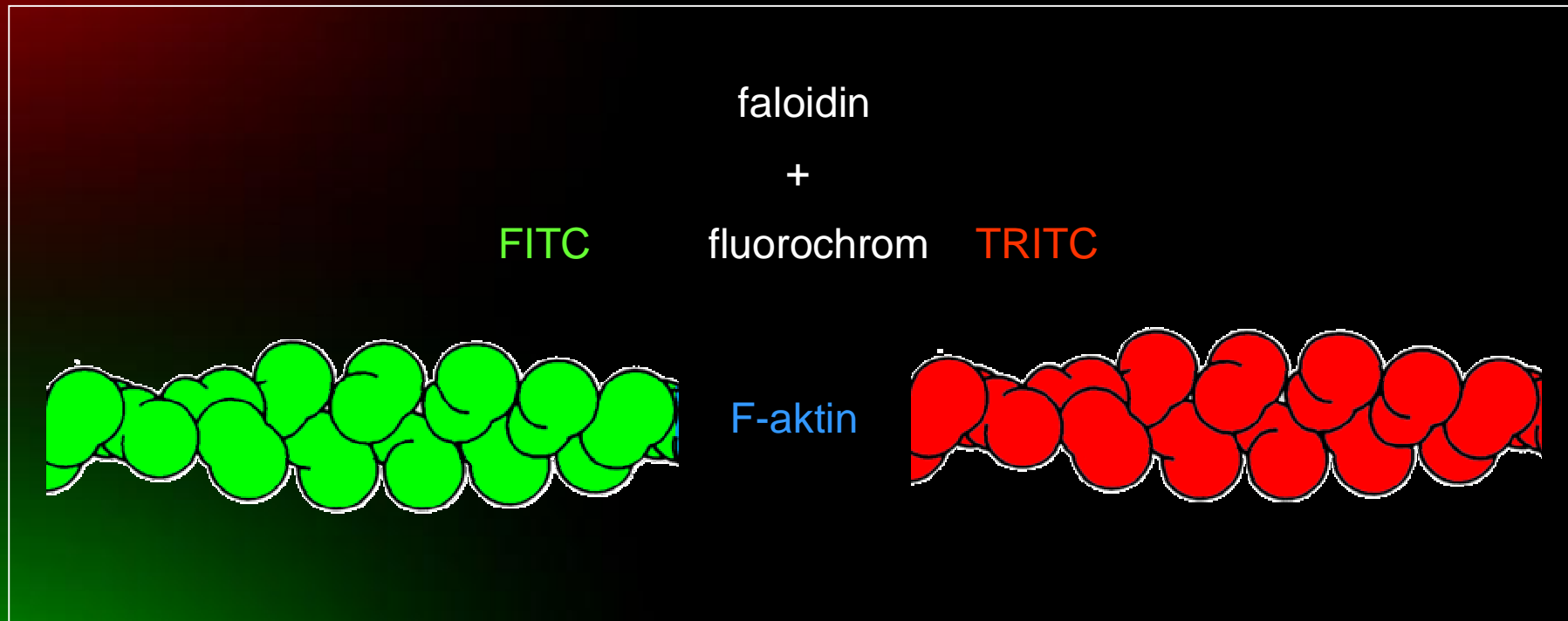
- optické řezy v rovinách XYZ , XZY
- schopnost zaznamenat změny i v časové rovině
- současné snímání obrazu v procházejícím a fluorescenčním světle
- použití dvou kanálů - barev zároveň
- volitelnost rychlosti rastrování => kvalita snímku
- kompenzace šumu, zesílení signálu

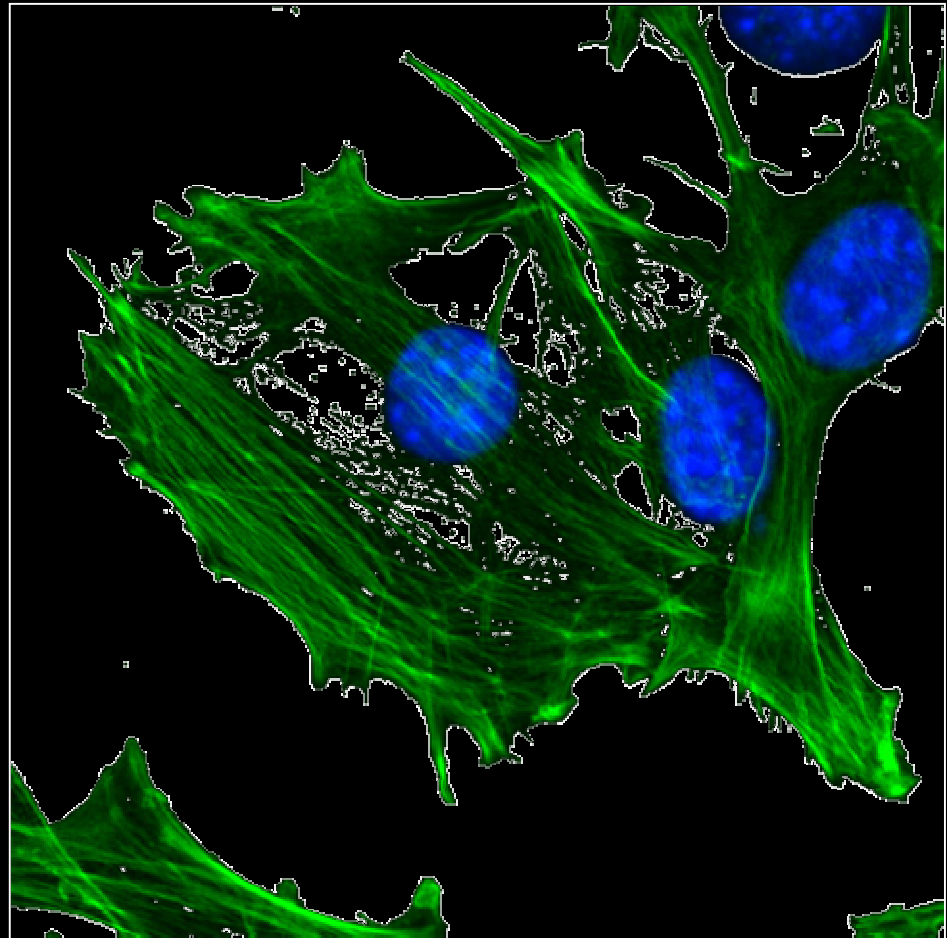
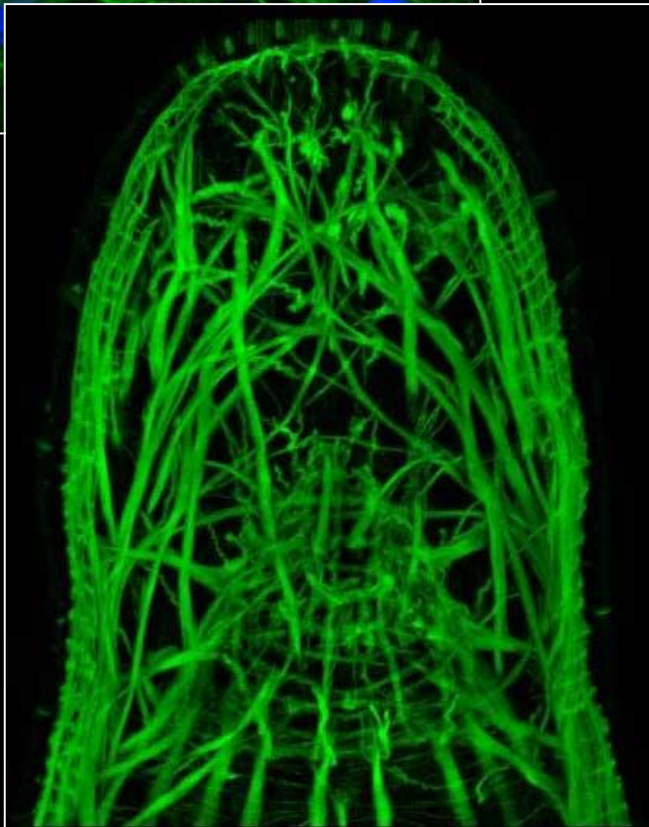
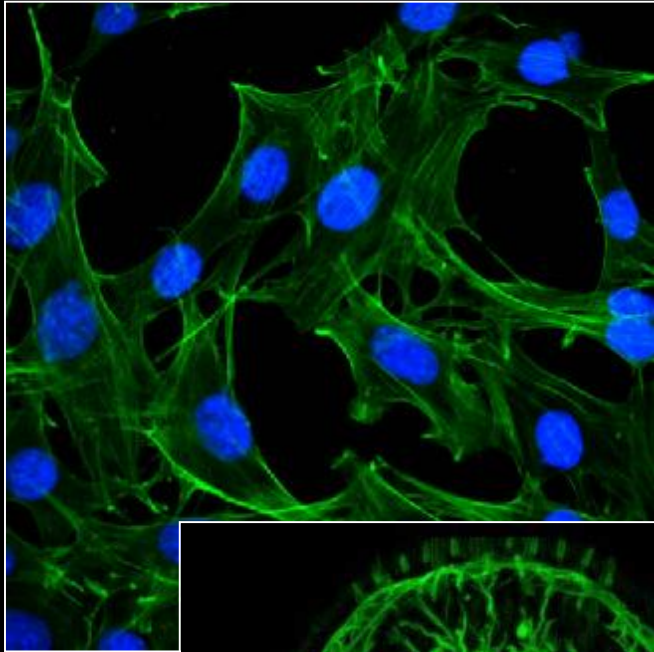
Metodika přípravy materiálu

(vazba F-aktin-faloidin)

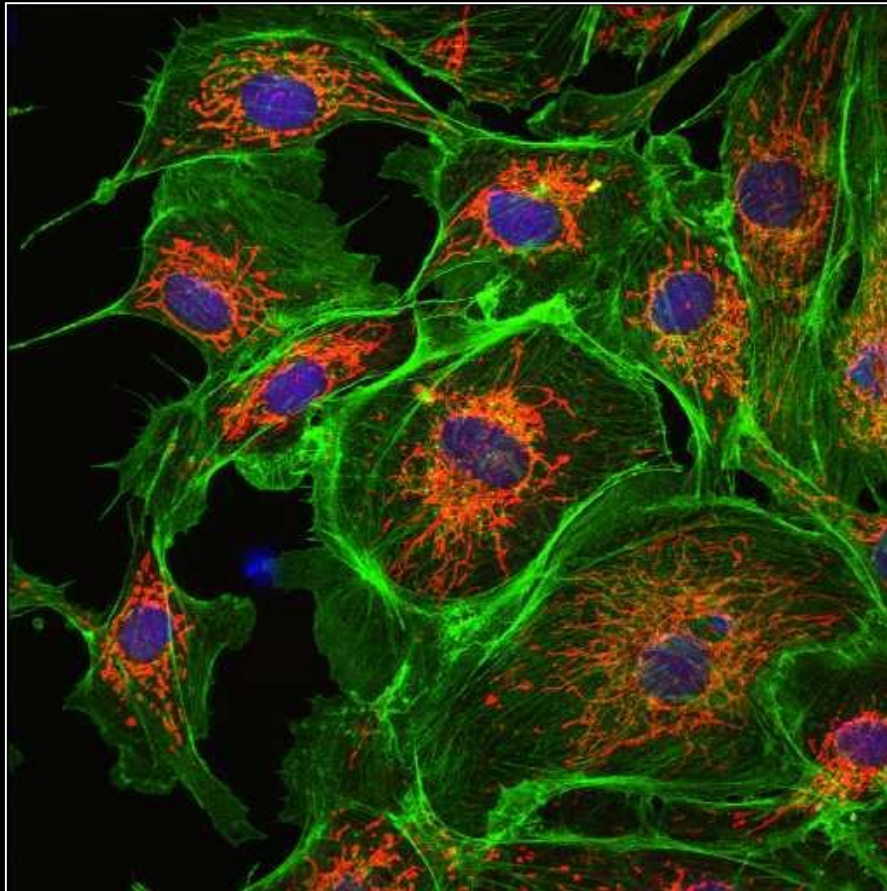
- fixace - 4% paraformaldehyd (PFA) ve fosfátovém pufru (PBS)
- promývání - antibody diluent (AbD)
- inkubace - faloidin značený fluorescein isothiokyanátem (FITC)
- faloidin značený tetrametylrhodamin isothiokyanátem (TRITC)
- promývání - antibody diluent (AbD)
- příprava dočasného mikroskopického preparátu

Metoda přímé fluorescence

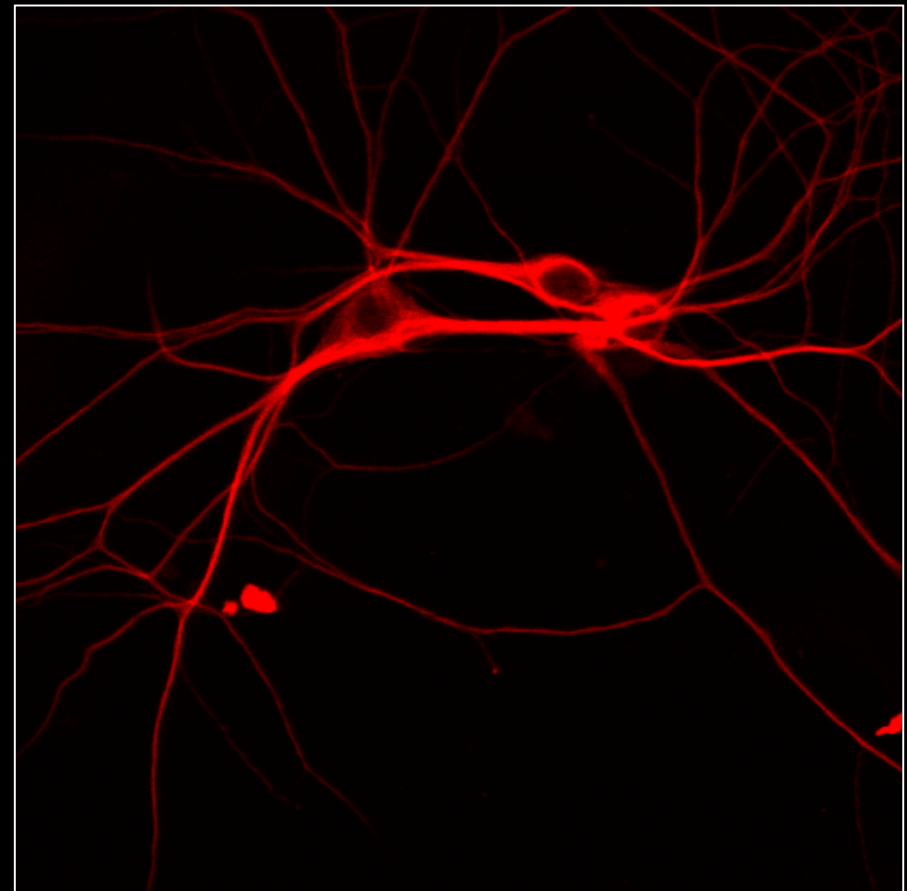




- vazba aktin-faloidin (FITC)
- vazba DNA-DAPI



- vazba aktin-faloidin (FITC)
- vazba DNA-DAPI
- vazba mitochondrie-mitotracker red



- neuron, vazba mikrotubulové proteiny-protilátka (Texas-RED)

Internetové odkazy

<http://137.120.28.214/cslm/lpath.mpg>

<http://www.microscopyu.com/articles/confocal/index.html>

<http://www.olympusmicro.com/primer/virtual/confocal/index.html>

<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/multiphoton/excitationbleaching/index.html>

<http://www.olympusmicro.com/primer/java/confocal/index.html>

<http://www.microscopyu.com/galleries/confocal/index.html>

http://www.lob.polytechnique.fr/themes/imagerie_fonctionnelle/Anim_cell1_small.gif