Automatyczny mikroskop fluorescencyjny - zastosowanie cyfrowych, chłodzonych kamer CCD w mikroskopii fluorescencyjnej

PRAKTIKUM Z BIOLOGII KOMÓRKI
(BT 206, BT 231)

Automatyczny mikroskop fluorescencyjny - zastosowanie cyfrowych, chłodzonych kamer CCD w mikroskopii fluorescencyjnej

Mikroskopia fluorescencyjna jest jedną z najbardziej powszechnie stosowanych technik wykorzystywanych w biologii komórki. Metoda ta pozwala na lokalizację w komórce dowolnych jej składników jeśli tylko posiadamy możliwość wcześniejszego wyznakowania ich fluorochromem o określonych właściwościach. Fluorescencja preparatu może mieć również pochodzenie naturalne (np. chlorofil), jednakże w zdecydowanej większości przypadków stosowane są fluorochromy zewnętrzne, które albo wykazują zdolność wybiórczego wiązania się z badaną strukturą lub substancją w komórce, albo są sprzęgane ze specyficznymi przeciwciałami lub sondami molekularnymi. Osobną grupę fluorochromów stanowią barwiki stosowane do pomiarów ilościowych, które zmieniają swoje właściwości spektralne po związaniu badanej substancji. Do tej grupy fluorochromów zaliczamy na przykład wskaźniki zmian stężenia jonów wapnia w komórce. Powszechne zastosowanie znajdują również ostatnio zielone białko fluoryzujące (ang. green fluorescent protein, GFP). Jest to naturalnie fluoryzujące białko pochodzące z meduzy Aequorea Victoria. W praktyce wykorzystywane w badaniach wydajności transfekcji komórek, jako cząsteczka reporterowa oraz jako białko fuzyjne (złożone z GFP i badanego białka) do przyżyciowych badań zmian lokalizacji białek komórce w czasie różnych procesów.

Obecnie większość oferowanych i stosowanych mikroskopów fluorescencyjnych to tzw. mikroskopy epi-fluorescencyjne. W mikroskopach tego rodzaju wzbudzenie próbki falą świetlną, jak i obserwacja światła emitowanego zachodzą z tej samej strony preparatu, przez obiektyw, który pełni tutaj również funkcję kondensora. Kluczowy dla bardziej złożonych zastosowań mikroskopii fluorescencyjnej jest sposób rejestracji obrazu powstającego pod mikroskopem. Jedną z takich możliwości jest zastosowanie cyfrowych, chłodzonych kamer CCD. Technika tak pozwala na bezpośrednie zapisanie obrazu w postaci cyfrowej poprzez pomiar jasności poszczególnych pikseli (punktów) matrycy CCD, na którą pada światło poprzez obiektyw. Matryca CCD (ang. Charge Coupled Device) składa się wielu elementów światłoczułych, z których każdy rejestruje sygnał elektryczny proporcjonalny do ilości padającego na niego światła. Pojedynczy element światłoczuły przekazuje zatem informację dotycząca wartości piksela (w więc jego jasności) w obrazie na ekranie komputera. Kamery stosowane w mikroskopii fluorescencyjnej pozawalają na obrazowanie nawet bardzo słabych sygnałów z uwagi na możliwości stosowania długich czasów integracji obrazu (regulowanego czasu naświetlania). Funkcja ta z uwagi na poziom generowanych szumów wymaga jednak stosowania chłodzenia. Dostępne obecnie kamery pozwalają na otrzymywanie bardzo dobrej jakości, kontrastowych obrazów nawet z preparatów charakteryzujących się bardzo słabym sygnałem emisji.

Stosowane obecnie coraz powszechniej w praktyce laboratoryjnej mikroskopy fluorescencyjne charakteryzują się coraz większą automatyzacją wszystkich podstawowych funkcji. Celem ćwiczeń jest zapoznanie się z działanie mikroskopu Leica DM IRE2 oraz programu Leica FW4000. Automatyczny mikroskop fluorescencyjny Leica DM IRE2 wyposażony jest w cyfrową chłodzoną kamerę CCD umożliwiający m.in. akwizycję obrazu w trybie „time-lapse” z możliwością dowolnego projektowania przez użytkownika trybu pracy (ustawianie parametrów pracy kamery, otwierania i zamykania migawek, zmian filtrów, ustawiania odstępów czasowych, zmiany położenia stolika zarówno w płaszczyźnie x,y,z,

możliwość prowadzenia rejestracji obrazów z kilku miejsc preparatu w czasie jednej sekwencji). Oprogramowanie zarządzające systemem pozwala jednocześnie na akwizycję obrazów mikroskopowych w trybie „z-stack" i złożone operacje na plikach graficznych, w tym ich dekonwolucję (dekonwolucja w oparciu o funkcje rozproszenia (ang. point-spread function – PSF)) wyliczaną przez program lub uzyskaną w wyniku pomiaru przez użytkownika, dynamiczne sekcjonowanie preparatów, pomiary i analiza obiektów dwu- lub trójwymiarowych (określenie powierzchni, kształtu, obwodu, położenia obiektu, parametry fotometryczne obiektu– sumaryczne i średnie wartości pikseli z analizowanego regionu itp.).

Oprogramowania sterujące pracą automatycznych mikroskopów fluorescencyjnych, różnią się od siebie w zależności od producenta i wersji mikroskopu. Jednakże filozofia ich działania jest zwykle bardzo podobna. Poznanie zasad działania jednego z takich systemów spowoduję, że poznanie prze użytkownika tajników działania innych systemów tego rodzaju będzie znacznie łatwiejsze i szybsze.

Cel doświadczenia:

Celem ćwiczenia jest praktyczne zapoznanie się z podstawowymi zasadami działania cyfrowych kamer CCD oraz zasadami obsługi automatycznego mikroskopu fluorescencyjnego.

Przebieg doświadczenia:

1. Uruchom program **Leica FW4000.**
2. W oknie Leica FW4000 **wybierz user name – DefaultUser** i naciśnij **Create New Experiment.**
3. W otwartym oknie wpisz nazwę swojego ekspperymentu, w **oknie Based on Experiment** naciśnij **Clear** a nastepnie **Create New**.
4. W oknie **Enter Information** wpisz krotki opis eksperymentu (w oknie **Comments**) i naciśnij **OK.**
5. Naciśnij przycisk **Setup** a następnie przycisk **λ .**
6. W oknie **Setup Fluorochromes** wybierz odpowiednie bloki filtrów dla stosowanych fluorochrów (BrightField, DAPI, TRITC) – naciśnij przycisk **Add**, wybierz z listy odpowiedni fluorochrom, naciśnij przycisk **Add**, operacje powtórz dla kolejnych fluorochromów, na zakończenie naciśnij przycisk **Close** i **OK**.
7. Naciśnij przycisk **X/Y.**
8. Okno Live Image Setup:

   Ikony kolorowe – poszczególne kanały dla różnych fluorochromów
   Aparat – zrobienie pojedynczego zdjęcia
   Zielony kwadrat/2 trójkaty – włącznik „żywego" obrazu
   Obiektyw – zmiana obiektywu
   Suwak – ustawianie czasu otwarcia przesłony kamery
   Gain – wzmocnienie obrazu
   Black/White – kontrast
   Lamp – regulacja intensywności świecenia lampy halogenowej

Umieścić pod mikroskopem oglądany preparat, wybrać obiektyw imersyjny x40 i ustawić przesłony do pracy w kontraście interferencyjnym Nomarskiego (przesłona kondensorowa: 40/63, pryzmat: E).

9. Wybrać kanał dla światła przechodzącego (**szara ikona**).Włączyć podgląd obrazu na monitorze (**ikona z zielonym kwadratem**), ustawić odpowiedni czas otwarcia przesłony - taki aby obraz na monitorze był najlepszy.
10. Wykonać zdjęcie naciskając **ikonę z aparatem.**
11. Zapisac obraz naciskając pole **Save in LabBook.**
12. Zmienić kanał na DAPI (niebieska ikona) i wykonać zdjęcia jak w pkt 9-11.
13. Zmienić kanał na TRITC (czerwona ikona) i wykonać zdjęcia jak w pkt 9-11.
14. Obejrzeć zapisane obrazy naciskając przycisk **Review.**
15. Uaktywnić obraz przez kliknięcie myszą.
16. Dokonać wstępnego elektronicznego przetworzenia otrzymanych obrazów wg następującego wzorca:

    a) Uaktywnić przerabiany obraz klikając ikonę odpowiedniego kanału
    b) Uruchomić opcję **Kontarst** z menu **Image**
    c) Korzystając z suwaków **Contrast, Brighness i Gamma** ustawić optymalnie wygląd obrazu
    d) Następnie nacisnąć przycisk **Apply** – obraz zostanie zapisany w folderze Processed
    e) W przypadku kanałów fluorescencyjnych uruchomić następnie narzędzie **Deconvolution**, ustawiając odpowiednie położenie suwaków: **Haze Removal**, **Smoothing** oraz **Spot Removal** ustawić najlepszy obraz dla danego kanału (podgląd przycisk **Review**, porównanie z wyjściowym – **Toggle**, powrót do wyjściowego obrazu - **Reset**).
    f) Po zakończeniu procedury wcisnąć przycisk **No Neighbours.**
    g) Operację powtórzyć dla wszystkich kanałów a następnie sporządzić obrazy złożone

17. Sporządzić następujące obrazy złożone:

    – Jądra komórkowe/aktyna
    – NIC/jądra
    – NIC/aktyna
    – NIC/aktyna/jądra

    a) (W menu **Image** uruchomić opcję **Composite** i sporządzić odpowiednie obrazy złożone)
    b) Ustawić odpowiednio intensywnść poszczególnych kanałów
    c) Zapisać poszczególne obrazy w formacie **bmp** (**File, save image as**) w kartotece **C:\pulpit\Moje dokumenty\PD**.

Z wykorzystaniem już ustawionych parametrów doświadczenia (przez wybranie jako wzorca już zapisanego eksperymentu) wykonać zapis innego miejsca preparatu przez kolejnych uczestników ćwiczeń.

Automatyczny zapis obrazów z kilku wybranych miejsc preparatu

1. W oknie **Leica FW4000** wybierz **User name – DefaultUser** i naciśnij - **Create New Experiment.**
2. W otwartym oknie wpisz nazwę swojego eksperymentu. W oknie - **Based on Experiment** wybierz jeden z poprzednio wykonanych eksperymentów a następnie - **Create New**.
3. W oknie **Enter Information** wpisz krótki opis eksperymentu (w oknie **Comments**) i naciśnij – **OK.**
4. Naciśnij przycisk - **Setup**, a następnie przycisk **λ.**
5. Zaznacz na przycisku **N** mały biały kwadracik w dolnym prawym rogu.
6. Naciśnij przycisk **X/Y**. Nastąpi aktywacja okna - **Live Image Setup.**
7. Włączyć podgląd obrazu na monitorze (**ikona z 2 trójkątami**), ustawić odpowiedni czas otwarcia przesłony - taki aby obraz na monitorze był najwyraźniejszy.
8. Uruchomić opcję - **Relative focus correction** (z Menu Hardware Setup), a następnie funkcję - **Set Z positions**.

    a) W uaktywnionym oknie podglądu obrazu ustawić w płaszczyźnie ostrości preparat w kanale pierwszym (**Bright field**), zatrzymać obraz (**ikona aparat fotograficzny**) i nacisnąć klawisz – **Next**, nastąpi zmiana kanału
    b) Ponownie ustawić preparat w płaszczyźnie ostrości, zatrzymać obraz i nacisnąć przycisk **Next**
    c) Całą procedurę powtórzyć dla 3 kanału
    d) Na zakończenie nacisnąć przycisk **Next**
    e) W uaktywnionym oknie **Focus correction** nacisnąć **OK**.

9. Uruchomić panel sterowania stolikiem (**Visit sites**) przyciskiem - **N**. Wybrać odpowiednie miejsce na preparacie i zapisać jego współrzędne **xyz**, naciskając w oknie - **Visit sites** przycisk - **Add**. Zmienić położenie stolika joystikiem i zapisać kolejne położenie preparatu. W ten sposób wybrać 3 miejsca na preparacie a następnie przycisnąć – **OK.**
10. Uruchomić zapisywanie obrazu przyciskiem – **Capture.**
11. Obejrzeć zapisane obrazy naciskając przycisk – **Review.**
12. Wybrać najlepszy zestaw obrazów i wysłać do dalszej analizy (zaznaczyć wybrane obrazy klikając biały kwadrat przy nazwie, wejść do **Menu - Gallery** i nacisnąć - **Export selected Images to Image Processing.**
13. Dokonać wstępnego elektronicznego przetworzenia otrzymanych obrazów.

Zagadnienia:

- Zasada działania mikroskopu fluorescencyjnego oraz kamer CCD
- Podstawowe pojęcia dotyczące komputerowej analizy obrazu

Zalecana literatura:

- Podstawy biologii komórki, Wprowadzenie do biologii molekularnej pod redakcją B. Alberts`a.
- http://www.microscopyu.com/articles/digitalimaging/index.html