

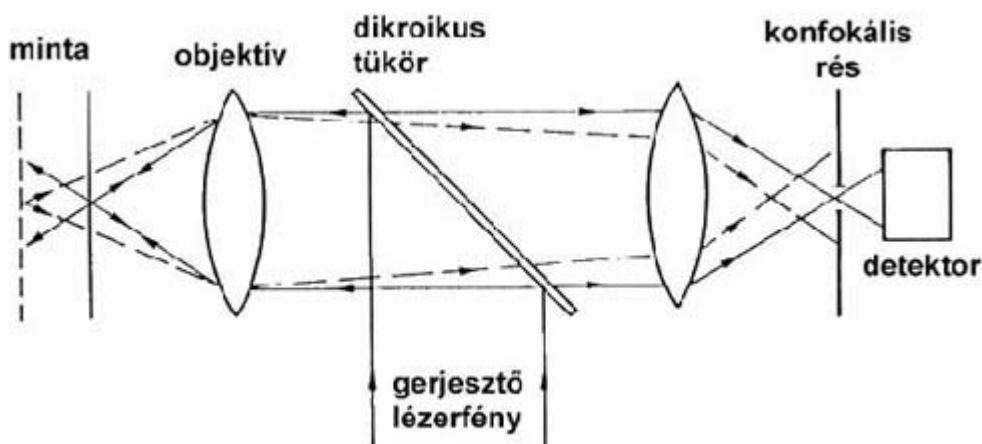
Konfokális mikroszkópia – elméleti bevezető

A konfokális mikroszkóp fluoreszcensen jelölt minták vizsgálatára alkalmas. Jobb felbontású képeket ad, mint a hagyományos fluoreszcens mikroszkópok, és képes "optikai szeletelésre", vagyis képet alkotni a minta egyetlen szeletéről. A kapott digitális kép számítógéppel kezelhető és elemezhető. Több szelet képét összerakva a fluorofór térbeli elhelyezkedése is vizsgálható.

1. A konfokális elv

A konfokális képalkotás lényege, hogy a rendszer csak a fókuszsíkból jövő fényt detektálja.

Az elrendezés az alábbi ábrán látható:



A hagyományos mikroszkópokkal szemben, ahol a minta egy területét éri a megvilágítás, a konfokális mikroszkópnál egyszerre csak a minta egy pontját világítják meg.

A lézer fényforrás fényét az objektív lencse a minta egy pontjára fókuszálja (ez esetben az objektív játssza a kondenzor szerepét is), majd a mintából eredő fluoreszcens ill. visszavert fényt ugyancsak az objektív gyűjti össze. A minta egy adott síkjából jövő fény az optikai rendszeren való áthaladás után egy adott fókuszpontban öszpontosul, majd a detektorba jut. Ha egy kicsiny átmérőjű rést úgy helyezünk el, hogy nyílása éppen erre a fókuszpontra essen, ez nem befolyásolja lényegesen a fókuszsíkból jövő fényt (folytonos vonal), viszont a fókuszsíkon kívülről jövő fényt szinte teljesen kirekeszti (szaggatott vonal).

Mivel egyszerre csak a minta egyetlen pontját világítja meg, a konfokális elrendezés önmagában nem ad képet. Ahhoz, hogy képet kapjunk, sorra végig kell pásztázzuk a vizsgálandó terület minden egyes pontját. Ezt a jelenleg használatos rendszerek többségénél pásztázó nyalábbal oldják meg (beam scanning). Ekkor az eltérített nyaláb sorra végigfut a terület minden pontján, épp úgy, ahogy az elektronsugár a tévé képernyőn. A detektor minden egyes pontban megméri a fény intenzitását, ezekből a

számítógép összerakja a képet.

2. A konfokális mikroszkóp előnyei

A hagyományos mikroszkópokkal szemben a konfokális mikroszkóp előnyei a következők:

- a) jobb felbontású képek készíthetők;
- b) képes kiszűrni a fókuszsíkon kívülről eredő fényt, így a képek kontrasztosabbak és kevésbé elmosódottak;
- c) az "optikai szeletelés" és a számítógépes adatfeldolgozás segítségével vastag minták 3-dimenziós struktúrái is feltérképezhetők.

Egy mikroszkóp kulcsfontosságú paramétere nem a nagyítás, hanem a felbontás. Egy tárgy képe elvileg végtelenszer felnagyítható, de ez nem jelenti azt, hogy további részleteket látunk majd a képen. Készíthetünk például egy fényképet a Holdról, de hiába nagyítjuk a képet tovább és tovább, sohasem fogjuk meglátni az asztronauták lábnyomát.

A felbontó- vagy feloldóképesség az optikai műszernek az a képessége, hogy két közeli, különálló, apró tárgy részlet képét különállónak adja vissza. A felbontás számértékkel úgy adható meg, mint az a legkisebb távolság két közeli, de különálló tárgypont között, amely esetén a két pont képe még különállónak látszik.

Elméletileg egy konfokális mikroszkóp felbontása fluoreszcens minták vizsgálata esetén 0,7-szerese egy hagyományos mikroszkóp felbontásának. Ez az optimális érték megközelíthető, de szennyezett, rosszul beállított optikai elemek, vagy rezgések csökkentik az elérhető felbontást.

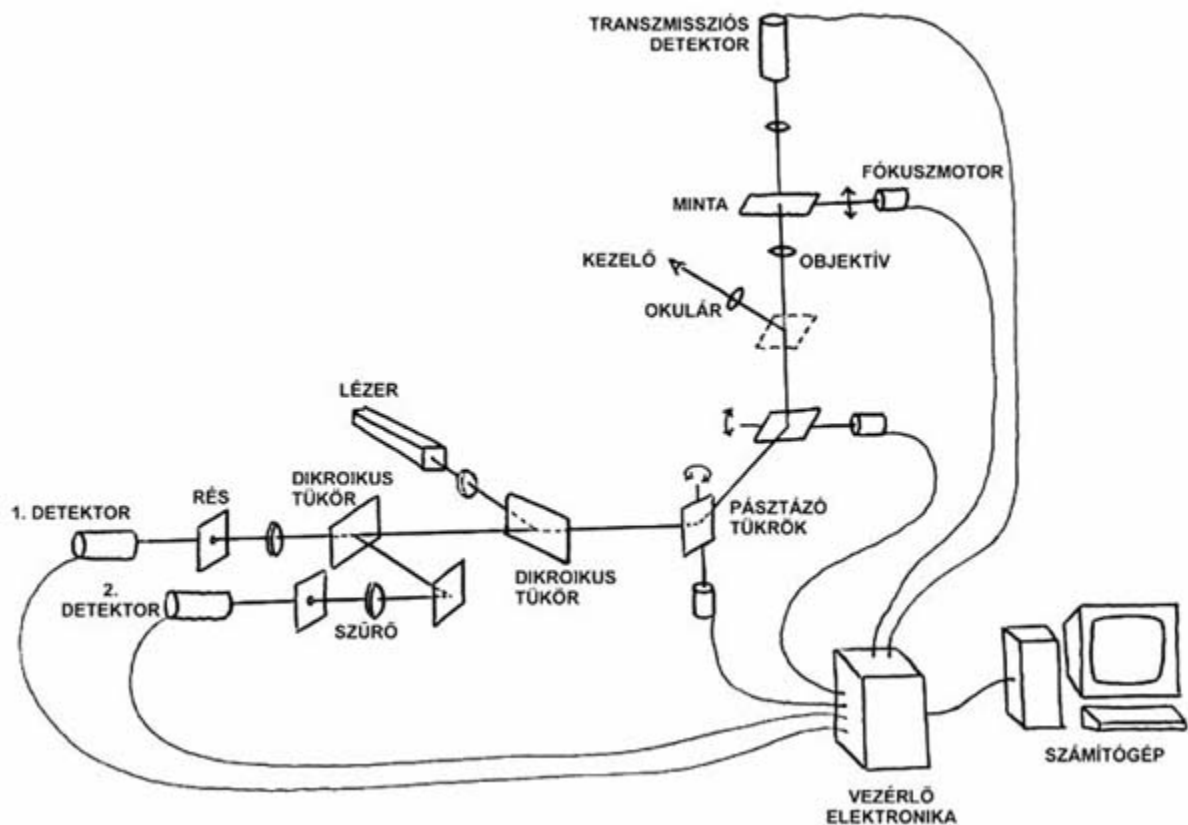
A minta fókuszsíkjából jövő fény képes áthaladni a fényútba helyezett kicsiny résen, és elérni a detektort. Ezzel szemben a rés a fókuszsíkon kívülről jövő fényt hatékonyan kizárja. Így a rendszer a mintának csak egy igen vékony szeletéről alkot képet. Az eljárást "optikai szeletelésnek" nevezik. Általa lehetővé válik vastag biológiai preparátumok nagyon vékony (akár 1 μm -nél vékonyabb) szeleteinek vizsgálata. Számos ilyen optikai szeletet készítve, finoman eltolva a fókuszst az egyes felvételek között, egy olyan képsorozatot kapunk, amely a minta 3-dimenziós szerkezetét tükrözi. A hagyományos, mechanikai metszési eljárásokkal szemben ez a következő előnyöket nyújtja:

- 1) sokkal gyorsabb;
- 2) a készített képek tökéletesen illeszkednek, leegyszerűsítve a térbeli rekonstrukciót;
- 3) élő minták is tanulmányozhatók.

Az optikai szeletelés akkor végezhető el, ha a minta szemitranszparens, mert ekkor a fény áthatolhat a felsőbb rétegeken, hogy megvilágítsa az alsóbbakat. Ez a feltétel szerencsére teljesül a legtöbb biológiai mintára. Konfokális mikroszkóppal néhány 100 μm vastagságú minták rutinszerűen tanulmányozhatók.

3. Felépítés

Egy konfokális rendszer gyakorlati megvalósítását az alábbi ábra vázolja:



Legtöbb esetben egy több hullámhosszú lézer szolgál fényforrásként. A fényútba helyezett szűrőkkel kiválasztható a kívánt hullámhosszú gerjesztés. A lézer fényét egy dikroikus tükrök a pásztázó tükrökre vetíti. A dikroikus tükröt a használt lézer hullámhosszának függvényében kell megválasztani, mégpedig úgy, hogy visszaverje a lézer fényét, de átengedje a mintából visszatérő fluoreszcenciát. A pásztázó tükrök a nyalábot két merőleges irányban képesek eltéríteni, összehangolt mozgásuk eredményeként a nyaláb végigpásztázza a kívánt területet. A fény ezután a mikroszkópba jut, amely egy hagyományos mikroszkóp, és amelynek objektívje a nyalábot a mintára fókuszálja. A mintából eredő fluoreszcens fény ugyanazon az úton, visszafelé halad, és áthalad az első dikroikus tükrön, amely átengedi a gerjesztő fényénél magasabb hullámhosszú fluoreszcenciát. A második tükrök a fluoreszcencia különböző színű komponenseit szétválasztja, és különböző detektorokhoz irányítja. A detektorok előtt elhelyezett rések kivágják a fókusz síkon kívülről jövő fényt. A detektorok mérik a fényerősséget, és a róluk érkező jelsorozat alapján az elektronika és a számítógép összerakja a képet.

A rendszer fontos eleme a számítógép által vezérelt fókuszmotor, amely az optikai szelektálás során meghatározott határok között pontosan eltolja a fókusz síkot, miközben a koordinátákat a számítógép rögzíti.

A mintából érkező fluoreszcens jel gyakran igen gyenge. A felvett kép jobb minőségű lesz, ha a rendszer több fényt gyűjt egy adott pontból, vagyis a nyaláb többet időz egy pontban. Ez azt jelenti, hogy a pásztázás lassúbb, egy kép felvétele pedig hosszú időt vesz igénybe. Sokszor, különösen kinetikai méréseknél, kompromisszumot kell kötnünk a pásztázás gyorsasága és a képminőség között.

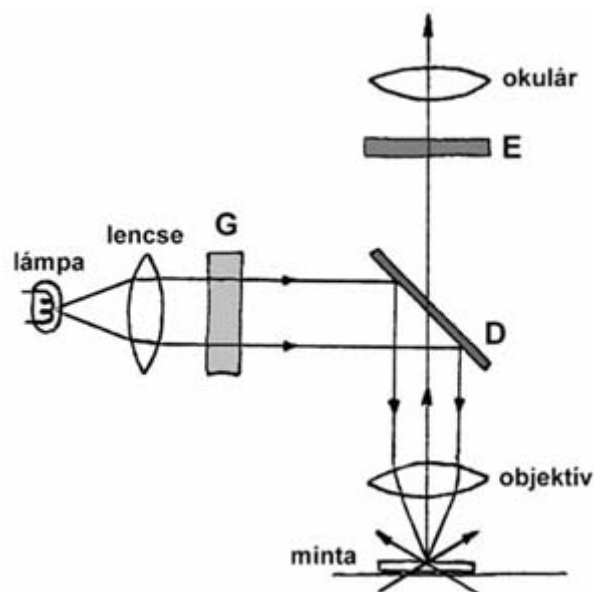
Alkalmos detektorral mérhető a mintán áthaladt fény intenzitása, amely alapján a rendszer létrehoz egy transzmissziós képet. Ez leginkább egy hagyományos világos látóterű vagy fáziskontraszt képhez hasonlít. Fontos megjegyezni, hogy a transzmissziós kép nem konfokális, tehát nem egy fókuszsíkot, hanem a minta egészét látjuk.

4. Fluoreszcencia

A konfokális mikroszkóp optikája a hagyományos fluoreszcens mikroszkópok sémáját követi.

A feladat a minta megvilágítása a fluorofór gerjesztési hullámhosszának megfelelő fényel, majd detektálnunk kell a fluorofór által kibocsátott, magasabb hullámhosszú fluoreszcens fényt. A mintából azonban nem csak fluoreszcens fényt, hanem szórt gerjesztő fényt is ered, így ha csak az előbbit akarjuk érzékelni, az utóbbit ki kell szűrni. Mindezt optikai szűrők és dikroikus tükrök segítségével oldják meg. Az optikai szűrők szinkomponensek kiszűrésére alkalmasak, azáltal, hogy csak adott hullámhossztartományban engedik át a fényt, a többi hullámhosszt pedig elnyelik. A dikroikus tükrök szinkomponensek szétválasztását végzik el: visszavernek egy adott hullámhossztartományba eső fényt, a többit pedig átengedik.

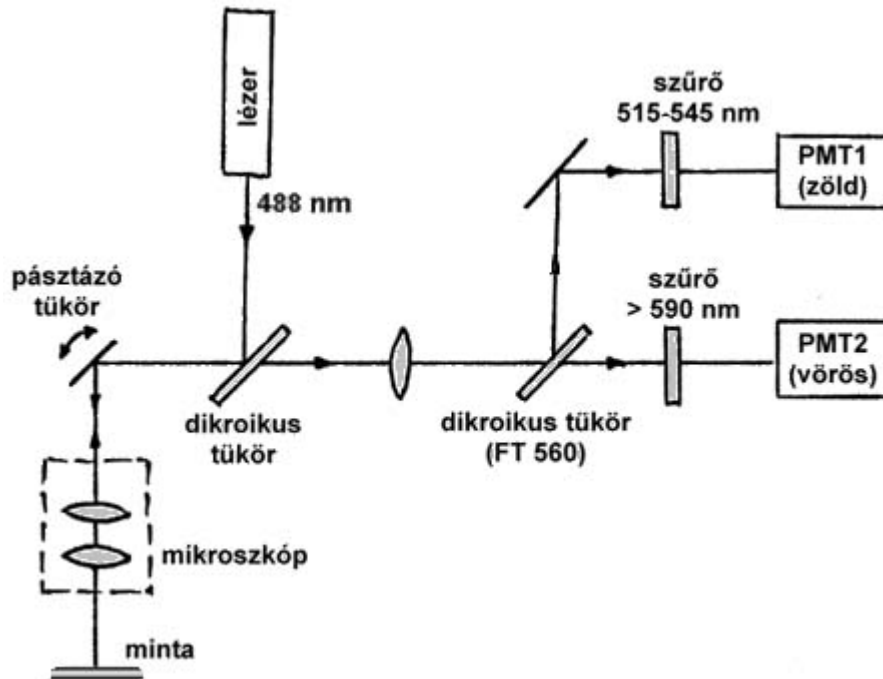
Az általánosan használt elrendezésben, amelyet epi-fluoreszcens elrendezésnek neveznek, a minta megvilágítása és a fluoreszcencia detektálása ugyanarról az oldalról történik:



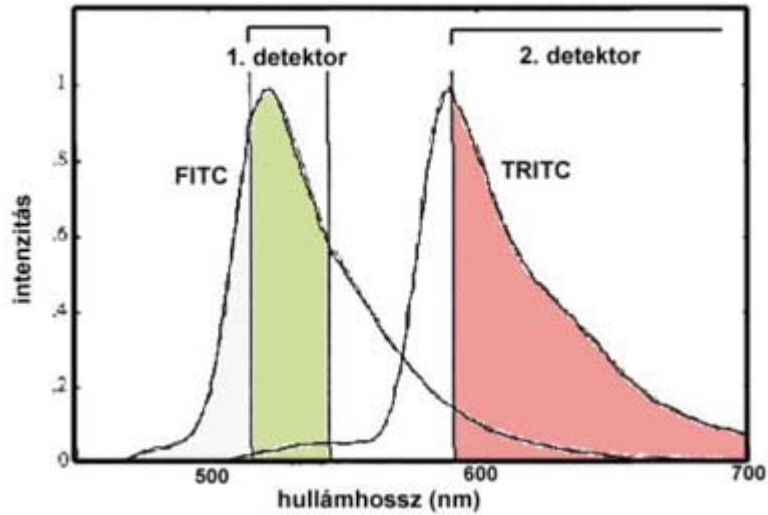
A kívánt gerjesztő hullámhosszt a gerjesztő szűrővel választják ki (G). Egy dikroikus tükör (D) vetíti a gerjesztő fényt a mintára, amely tükör ugyanakkor átengedi a mintából jövő fluoreszcens fényt. Végül egy emissziós szűrő (E) csak a vizsgálni kívánt színtartományt engedi át, valamint kivágja a maradék gerjesztő fényt is.

Egy konfokális mikroszkóp esetén az elrendezés lényegében ugyanaz, azzal a különbséggel, hogy a fényforrás lézer, a fluoreszcens fényt pedig nem a szemünk, vagy film, hanem egy detektor érzékeli. További különbség, hogy mivel a lézernyaláb egyszerre csak a tárgy egy pontját világítja meg, végig kell pásztázni a mintát, hogy egy területről képet kapjunk.

Kissé bonyolultabb elrendezést kell használni akkor, ha a minta különböző jelölőket tartalmaz, és fontos ezek fluoreszcenciájának egyidejű és független detektálása. Ennek érdekében a legtöbb konfokális rendszer több detektort tartalmaz, valamint további dikroikus tükröket, amelyek szétválasztják és a megfelelő detektorokhoz irányítják a különböző színű fluoreszcens fényeket. Az alábbi ábra egy két-detektoros elrendezést mutat, ilyen a jelenlegi MRC-1024 rendszer.

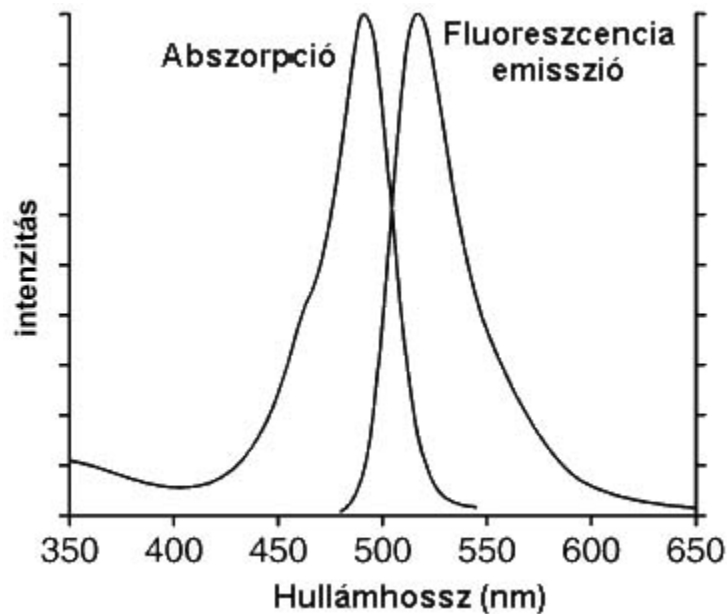


Tegyük fel, hogy egy zöldben illetve egy vörösben világító fluorofór fényét szeretnénk detektálni, legyenek ezek a FITC és a TRITC. A rendszerben két dikroikus tükör van. Az elsőt oly módon kell megválasztani, hogy visszaverje a gerjesztő lézerfényt (488 nm), de átengedje mind a zöld (500-550 nm), mind a vörös (>580 nm) fluoreszcenciát. A fluoreszcens fény az első tükrön való áthaladás után eléri a második tükröt, amely visszaveri a zöld színt, és átengedi a vöröset. Ily módon az egyik detektor a zöld fluoreszcenciát, a másik a vöröset érzékeli. További emissziós szűrők leszűkítik az érzékelt tartományt, kiszűrve bármilyen maradék gerjesztő fényt. Az alábbi ábra a FITC és a TRITC emissziós spektrumait mutatja, valamint azokat az "ablakokat", amelyeket a detektorok érzékelnek.



Zavarhatja a mérést, hogy gyakran nem lehetséges egy tartományban tisztán egyetlen fluorofór emisszióját mérni. Látható az ábrából, hogy a két fluorofór széles és részben átfedő spektruma miatt a vörös detektor a FITC emissziójának is érzékeli egy részét, annak ellenére, hogy a vörös detektor érzékelési tartományában mi csak a TRITC emisszióját szeretnénk mérni. Kisebb mértékben bár, de a TRITC jele is „átlóg” a zöld tartományba. Emiatt a különböző jelölők fluoreszcenciájának tökéletes szétválasztása lehetetlen. Azt mondhatjuk, hogy kettős jelöléshez lehetőség szerint olyan jelölőpárt kell választani, amelyeknél ez az átfedés minimális.

Fluoreszcens jelölők abszorpciós és emissziós spektrumaiból megállapíthatjuk, hogy gerjeszthető ill. detektálható-e az illető festék a rendelkezésre álló rendszerrel. Az alábbi ábra a fluorescein abszorpciós és emissziós spektrumát mutatja.



Táblázatok megadják a fluoreszcens festékek gerjesztési ill. emissziós maximumait. Ezek az értékek a két spektrum csúcsainak felelnek meg, viszont nem jelentik azt, hogy a festék kizárólag az illető hullámhosszon gerjeszhető vagy detektálható. A festék, igaz, kisebb hatásfokkal, gerjeszhető abban a tartományban, ahol számottevő abszorbciónal rendelkezik. Ez az, ami leolvasható a spektrumból, de nem tudható meg az abszorbciónal és emissziós maximumok alapján.

Kétszínű jelölés esetén a jó felvételek kulcsa, hogy ismerjük a használt fluorofórok spektrumát vagy emissziós maximumait, mert a szűrőket és tükröket ennek alapján kell kiválasztani.

5. Képezelés

A konfokális mikroszkóp által készített képek nem analóg, hanem digitális képek. A folytonos képet a digitalizálás során véges számú képpontra osztják fel, a végső képet pedig sorokban és oszlopokban elhelyezkedő képpontok, az ún. pixelek alkotják. Az egyes képpontok fényességét egy 256 árnyalatból álló skálán adják meg, ahol 0 a fekete, 255 a fehér, a közöttük lévő értékek pedig köztes árnyalatokat jelentenek. A digitális kép tehát egy pontrác, amelynek minden pontja a 0-255 skálán megadott fényességgel rendelkezik.

Egy megfelelő felbontású digitális kép folytonos benyomást kelt. A kép felbontását a képpontok sorainak és oszlopainak számával adják meg (pl. 512×512). A nagyobb képeknek természetesen nagyobb a helyigénye a számítógépen való tároláskor. Egy 512×512 pixeles kép helyigénye kb. 1/4 MB, három színben ugyanez 3/4 MB. Egy 1024×1024 pixeles kép nagyjából 1 MB-ot foglal. Szeletek készítésekor mindezt meg kell szorozni a szeletek számával, amely sok szelet esetén egészen tekintélyes adathalmaz lehet.

Standard képezelő eljárások

A képezelés során a kezdeti képet átalakítják annak érdekében, hogy pl. kiszűrjék a zajt, kiemeljenek adott részleteket, vagy emberi szem számára érzékelhetőbbé tegyenek különbségeket.

Fényesség, kontraszt, küszöb

Ideális esetben egy képen a 0-tól 255-ig terjedő teljes intenzitásskálát kihasználjuk. Ha pl. egy képen a minimális intenzitás 0, a maximális pedig 35, ez a kép azért gyenge minőségű, mert nem láthatóak az intenzitásbeli különbségek (minden pixel a feketéhez közeli árnyalatú). Az ilyen hibát a kép felvételekor kell helyrehozni, mindazonáltal ha minden pixel 0-35 közötti intenzitású, ez a tartomány kinyújtható a teljes skálára azáltal, hogy minden képpont értékét megszorozzuk 7-el. Ekkor a skála 0-tól 245-ig tart majd. Nem lineáris átalakítással a tartomány egyes kiemelésre szánt részei jobban felerősíthetők.

Alacsony intenzitású pixelekből álló zaj megszüntethető, ha egy adott küszöbintenzitás alatt minden képpontot feketére változtatunk.

Simítás és szűrés

Bizonyos esetekben a kép igen zajos, azaz nagy a közeli képpontok közötti különbség. Térbeli átlagolással, vagy simítással elmoshatók a különbségek, viszont ezáltal a felbontásból is veszítünk.

Adott szűrőkkel élesíthető a kép, így láthatóvá tehetők egyes részletek. Az eljárás hátránya, hogy éppúgy kiemeli a zajt és az apró képi hibákat. Az élesítés főleg akkor hasznos, ha a minta finom struktúrákat tartalmaz.

Nagyítás és kicsinyítés

Ez a kép felbontásának, tehát a képpontok számának növelését vagy csökkentését jelenti. Kicsinyítéskor egybemosódhatnak fontos részletek, tehát csökken a felbontás, nagyításkor viszont nem nő a kép valódi felbontása, csak a mérete.

Szintáblák, álszínek

Segítheti a megjelenítést, ha a szürke árnyalatok skáláját egy másik színskálával helyettesítjük.

Több színű jelölés esetén a különböző jelölők eloszlását ábrázoló képekhez zöld, piros illetve kék színeket rendelnek, majd a képeket egymásra helyezik. Hozzárendelhető pl. a zöld szín a FITC képhez, a vörös pedig a rodaminhoz, így a két jelölő viszonya egy képen vizsgálható.

Fontos megjegyezni, hogy a konfokális mikroszkóp által készített kép nem színes, csupán egy intenzitáseloszlást ábrázol. Az általunk hozzárendelt álszín teljesen önkényes, és bár megtehetjük, hogy a vörös fluorofór képéhez vörös színt rendelünk, ennek nincs köze a fluoreszcencia valódi színéhez.

Mivel az emberi szem nem képes pontosan megkülönböztetni a szürke egyes árnyalatait, a szürke színskálát helyettesíthetjük egy váltakozó színeket tartalmazó palettával (pl. a szivárvány színei), megkönnyítve ezzel a különbségek érzékelését. A megjelenítésen túl ennek nincs különösebb jelentősége, ez csupán játék a színekkel.

A szürke színskala helyettesítésére használt szintáblák neve az angolban "lookup table" (LUT).

3D képkalkotás

A szeletekből a gép egy 3 dimenziós képet rak össze, amely többféle módon ábrázolható.

Megjeleníthető pl. úgy, hogy az egyes szeleteket adott módon egymásra összegezzük. Az összegzés elve lehet az, hogy minden képpontba a különböző mélységekből rögzített intenzitások közül a maximális érték kerül.

Összeadhatók a képpontok úgy is, hogy az egyes szeletek különböző súllyal szerpeljenek a végső képben. Amit így kapunk tulajdonképpen nem más mint a teljes minta fluoreszcens képe, ez a kép viszont egyértelműen részletgazdagabb, mint egy nem konfokális technikával készült fluoreszcens kép.

Újabb lehetőségként létrehozható a 3d struktúra bármilyen metszete.

A szeletek sorozata ezenkívül tetszőleges irányra levetíthető, tehát a minta "megtekinthető" különböző irányból. Akár a szeletekre síkjára merőleges vetület is vizsgálható. A minta különböző szögekből felvett vetületeit egymás után levetítve mozgó képet kapunk, amely olyan hatást kelt, mintha a minta forogna.